

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de técnicas espectroscópicas para el estudio y  
análisis de moléculas de interés biológico**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Jorge B. Jiménez Sánchez**

**Directores**

**Ángel González Ureña  
José M<sup>a</sup> Orea Rocha**

**Madrid, 2018**

**DESARROLLO DE TÉCNICAS  
ESPECTROSCÓPICAS PARA EL ESTUDIO  
Y ANÁLISIS DE MOLÉCULAS DE INTERÉS  
BIOLÓGICO**

***TESIS DOCTORAL***

**JORGE B. JIMÉNEZ SÁNCHEZ**

**DIRECTORES:**

**ÁNGEL GONZÁLEZ UREÑA**

**JOSÉ M<sup>a</sup> OREA ROCHA**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
INSTITUTO PLURIDISCIPLINAR  
UNIDAD DE LASERES Y HACES MOLECULARES**

***MADRID, DICIEMBRE 2006***

*A mis Padres y a Julia*

## **AGRADECIMIENTOS.**

El trabajo que aquí se presenta solamente ha sido posible gracias al apoyo y ayuda que me han brindado:

Los directores de la tesis: el Profesor Ángel González Ureña, quién me dió la oportunidad de adquirir una formación científica. Su continua y constante disponibilidad ha sido un auténtico estímulo durante el desarrollo de todo este trabajo. Al Doctor José M<sup>a</sup> Orea Rocha, por su paciencia y apoyo incondicional a lo largo de todo este trabajo. A ambos directores les agradezco las largas jornadas de disertación científica que han contribuido en una gran medida a mi aprendizaje y capacidad de abordar los problemas científicos con una mentalidad crítica y abierta.

A mis compañeros de trabajo Jesús Tornero, Cristina Alonso, Montserrat Morato, Aranzazu Vera, Stefan Skowronek, Jorge Cáceres, Germán Velasco, Mar Santos, con quiénes he compartido momentos muy buenos, así como a Alicia González recientemente incorporada. A las personas que han pasado por la Unidad y con las que también he compartido excelentes momentos: Rafael Pereira, Miguel de Castro, Asunción García, Taieb Gasmi, Khaled Gasmi y Carlos Montero.

A la profesora del departamento de Química Analítica D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Jesús Santos Delgado por su contribución al análisis por técnicas de cromatografía líquida. Su simpatía y amabilidad ha sido una muestra de lo grato que puede llegar a resultar una colaboración. A una antigua compañera de Facultad, Esther Crespo Corral, por su apoyo en la última etapa de esta tesis tanto a nivel experimental como personal.

Al profesor Titular del departamento de Química Física D. Manolo Gil Criado por su gran contribución en el apartado de espectroscopia de esta tesis con quién además he disfrutado de buenas conversaciones así como por los buenos consejos recibidos.

A la profesora del departamento de Ciencia y Tecnología de los Productos Vegetales del Instituto del Frío del CSIC Dra. D<sup>a</sup> Carmen Merodio por su contribución en el apartado genético.

A Segundo Sánchez, responsable del taller mecánico, por su gran labor en la elaboración de las piezas solicitadas, así como al taller de Físicas por la ejecución de alguna

pieza complementaria. A Luis Luján, responsable del taller electrónico, por sus buenas ideas y ejecuciones de los trabajos.

A mis buenos amigos Pedro Pablo Gámez, Jaime Hernández de la Fuente, Fernando López Terciado y Javier Gutierrez a quienes les estoy muy agradecido por el apoyo y ánimo que han sabido darme de forma incondicional.

Y finalmente destaco a Dios y a mi familia a quienes debo todo lo que soy, para quienes todos los agradecimientos resultarían escasos. Sin ellos no habría sido capaz de llevar a cabo tal empresa. Por su apoyo incondicional y la ilusión y el ánimo que me han infundido. Y junto a ellos incluyo a Julia, con quién he compartido cada momento, cada pequeña frustración y cada alegría a lo largo de este periodo.

Deseo agradecer también las subvenciones dadas por el CRDO “Uva de mesa embolsada Vinalopó”, así como los proyectos CT98-4211 y CTQ2004-03468 del MEC y la ayuda de grupos de investigación de la CAM, sin las cuales no se hubiera podido llevar a cabo este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL.

<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Antecedentes	2
1.2. Incorporación del láser a las técnicas de análisis	6
1.3. Metas y objetivos de la tesis	9
<b>2. SISTEMA EXPERIMENTAL</b>	19
2.1. LD-REMPI-TOF	20
2.1.1. Preparación de la muestra	28
2.1.2. Condiciones de medida	30
2.2. GC-REMPI-TOF	32
2.2.1. Condiciones de medida	44
2.3. Máquina de Haces Moleculares	44
2.3.1. Preparación de la muestra	48
2.3.2. Condiciones de medida	48
2.4. Cámara de anoxia	49
2.4.1. Condiciones de medida	50
2.5. Detectores y aparatos complementarios	50
<b>3. RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS</b>	54
3.1. Desarrollo instrumental y mejora de la técnica LD-REMPI-TOFMS	55
3.2. Espectroscopia molecular	56
3.2.1. Espectro REMPI de la molécula de trans-resveratrol	58
3.2.1.1. Resultados obtenidos por LD-REMPI-TOFMS	58
3.2.1.2. Resultados obtenidos por expansión supersónica	60
3.2.2. Espectro vibracional por FTIR de la molécula de trans-resveratrol y relacionados	63
3.3. Aplicaciones analíticas	66
3.3.1 Detección de trans-resveratrol en muestras naturales mediante la técnica LD-REMPI-TOFMS	66
3.3.2. Comparación del análisis de trans-resveratrol por las técnicas LD+REMPI-TOFMS y RP-HPLC	69
3.3.3. Métodos de aumento del contenido endógeno de trans-resveratrol en uvas	76
3.3.3.1. Experimentos de anoxia	77



3.3.3.1.1. Uva.....	77
3.3.3.1.2. Vino.....	80
3.3.3.2. Tratamientos a baja temperatura en atmósfera controlada.....	84
3.3.3.3. Elicitación resonante de trans-resveratrol en la piel de la uva.....	90
3.3.4. Aplicación externa de extractos naturales obtenidos de la vid como método de aumento de la resistencia de la uva a la infección y maduración.....	99
<b>4. RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ACOPLADAS CROMATOGRAFÍA.....</b>	<b>103</b>
4.1. GC-REMPI-TOFMS.....	104
4.1.1. Detección de compuestos vía GC.....	106
4.1.1.1. Parámetros cromatográficos del trans-estilbeno.....	106
4.1.1.2. Detección cromatográfica de una mezcla de moléculas conocidas.....	109
4.1.2. Medida de patrones puros por GC-REMPI-TOFMS.....	113
4.2. Validación de la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	115
4.2.1. Repetibilidad.....	116
4.2.2. Reproducibilidad.....	118
4.2.3. Linealidad.....	119
4.2.4. Selectividad.....	120
4.2.5. Exactitud.....	121
4.2.6. Límite de detección.....	122
4.2.7. Límite de cuantificación.....	124
4.3. Análisis de trans-estilbeno en la piel de la uva.....	124
4.3.1. Análisis de trans-estilbeno en piel de uva por GC.....	124
4.3.2. Análisis de trans-estilbeno en piel de uva GC-REMPI-TOFMS.....	126
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>128</b>
5.1. Desarrollo Instrumental y Mejora de la técnica LD-REMPI-TOFMS.....	129
5.1.1. Resolución.....	130
5.2. Espectroscopia molecular.....	132
5.2.1 Análisis del espectro REMPI obtenido por LD-REMPI-TOFMS.....	132
5.2.2 Análisis del espectro REMPI obtenido con la máquina de Haces Moleculares.....	134

5.2.3 Análisis espectroscópico de las bandas en el estado torsional del trans-resveratrol.....	136
5.2.3.1. Espaciado en el espectro REMPI de la molécula de trans-resveratrol.....	136
5.2.3.2 Caracterización por teoría de grupos de la molécula de trans-resveratrol.....	139
5.2.3. Estudio del espectro de IR de las moléculas de trans-estilbeno y trans-resveratrol.....	142
5.2.3.1. Estudio del espectro de IR de la molécula de trans-estilbeno.....	142
5.2.3.2. Estudio del espectro de IR de la molécula de trans-resveratrol.....	146
5.3. Aplicaciones analíticas.....	153
5.3.1 Análisis de trans-resveratrol en muestras naturales por LD-REMPI-TOFMS.....	153
5.3.2. Comparación del análisis de trans-resveratrol por las técnicas LD-REMPI-TOFMS Y RP-HPLC.....	155
5.3.3. Métodos de aumento del contenido endógeno de trans-resveratrol en uvas.....	157
5.3.3.1. Experimentos de anoxia.....	157
5.3.3.1.1 Uva.....	157
5.3.3.1.2 Vino.....	159
5.3.3.2 Tratamientos a baja temperatura en atmósfera controlada.....	160
5.3.3.3 Elicitación selectiva de trans-resveratrol en piel de uva mediante irradiación UV.....	164
5.3.4. Aumento de la durabilidad de las uvas mediante la aplicación externa de extractos naturales.....	166
5.4. Resultados por técnicas espectroscópicas acopladas a cromatografía.....	168
5.4.1. Detección de compuestos vía GC.....	168
5.4.1.1. Análisis por GC del trans-estilbeno.....	168
5.4.1.2 Detección cromatográfica de una mezcla de moléculas conocidas.....	169
5.4.2. Medida de patrones puros en GC-REMPI-TOFMS.....	170

5.4.2.1 Calibración en masas para la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	170
5.5. Validación de la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	177
5.6. Análisis de trans-estilbeno en piel de uva.....	179
5.6.1. Análisis de trans-estilbeno en piel de uva por GC.....	179
5.6.2. Análisis de trans-estilbeno en piel de uva por GC-REMPI-TOFMS.....	180
5.7. Comparación de las técnicas GC/GC-REMPI-TOF y GC-REMPI-TOFMS.....	182
5.7.1. Límite de detección por la técnica LD-REMPI-TOFMS.....	182
5.7.2. Comparación de los límites de detección.....	184
<b>6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>187</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>194</b>
<b>8. ANEXOS: PUBLICACIONES Y PATENTES HASTA EL MOMENTO ACTUAL RELACIONADOS CON ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.....</b>	<b>214</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

## SISTEMA EXPERIMENTAL.

Figura 2.1. Disposición general de los elementos en la técnica LD-REMPI-TOFMS.....	20
Figura 2.2. Vista frontal de los procesos de desorción e ionización.....	22
Figura 2.3. Disposición general del sistema de placas aceleradoras y detección.....	24
Figura 2.4. Detalle de las distancias recorridas por la molécula desde que es ionizada.....	25
Figura 2.5. Sistema dispersor de la muestra sobre el disco de pyrex.....	29
Figura 2.6. Surco producido por el láser de desorción al incidir sobre la muestra.....	31
Figura 2.7. Vista general del sistema experimental GC-REMPI-TOFMS.....	32
Figura 2.8. Disposición de los elementos constitutivos de la interfaz entre las técnicas GC y REMPI-TOFMS.....	40
Figura 2.9. Vista general de la máquina de Haces Moleculares.....	46
Figura 2.10. Dispositivo experimental para los tratamientos de anoxia.....	50

## RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.

Figura 3.1. Desorción delantera con vástago Varian 316.....	55
Figura 3.2. Desorción delantera con vástago PFEIFFER 243010-T.....	56
Figura 3.3. Espectro REMPI en el intervalo 301-308 para la molécula de trans- resveratrol obtenido con una resolución de 0,1 nm.....	59
Figura 3.4. Bandas vibracionales obtenidas de la desorción de trans-resveratrol por la técnica LD-REMPI-TOFMS.....	60

Figura 3.5. Espectro obtenido por la máquina de haces moleculares para la molécula de <i>trans-resveratrol</i> .....	62
Figura 3.6. Espectro REMPI para la molécula de <i>trans-resveratrol</i> en el intervalo 300,8-303 obtenido por medio de la máquina de Haces Moleculares.....	63
Figura 3.7. Espectro FTIR de la molécula de <i>trans-resveratrol</i> por la técnica de reflectancia difusa.....	65
Figura 3.8. Estructura de la molécula de <i>trans-estilbeno</i> .....	65
Figura 3.9. Espectro FTIR de la molécula de <i>trans-estilbeno</i> por la técnica de reflectancia difusa.....	66
Figura 3.10. Espectro de masas típico de piel de uva obtenido por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS.....	68
Figura 3.11. Espectro de masas típico de bistorta obtenido por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS.....	69
Fig 3.12. Cromatograma de hoja de vid obtenido por detección fluorométrica $\lambda_{ex}$ de 330 nm y $\lambda_{em}$ de 374 nm.....	72
Fig 3.13. Rectas de calibrado por adiciones estándar en la muestra y calibrado externo en el intervalo de 0,5 a 5 mgL <sup>-1</sup> haciendo uso de RP-HPLC.....	73
Figura 3.14. Espectro de masas de una muestra de hoja de la variedad Aledo.....	74
Figura 3.15. Calibración por el método de adiciones estándar desde 0,5 a 5 mgxL <sup>-1</sup> por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS.....	75
Figura 3.16. Contenido de <i>trans-resveratrol</i> en piel de uva tras los diferentes tratamientos anóxicos.....	78

Figura 3.17. <i>Evolución del contenido de trans-resveratrol en los días posteriores al tratamiento anóxico.....</i>	79
Figura 3.18. <i>Espectros de tiempo de vuelo obtenidos a partir de dos muestras de vino. Superior: vino elaborado con uvas no tratadas. Inferior: vino elaborado con uvas sometidas a tratamiento anóxico.....</i>	83
Figura 3.19. <i>Evolución del contenido de trans-resveratrol en uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y sin tratar.....</i>	87
Figura 3.20. <i>Seguimiento de la evolución de la transcripción del gen de la STS para las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y sin tratar.....</i>	88
Figura 3.21. <i>Evolución en los niveles de ARNm y trans-resveratrol así como porcentaje de marchitamiento total para las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y no tratadas una vez puestas en condiciones de almacenamiento normales de mercado.....</i>	89
Figura 3.22. <i>Vista en planta del sistema empleado en la irradiación de las uvas.....</i>	92
Figura 3.23. <i>Cromatograma obtenido por HPLC y detección espectrofotométrica a la longitud de onda de 306 nm correspondiente a la muestra de control (uvas no irradiadas).....</i>	95
Figura 3.24. <i>Espectro REMPI de la molécula de trans-resveratrol en el que se indican las dos longitudes de onda empleadas en la irradiación de las uvas.....</i>	96
Figura 3.25. <i>Cromatogramas correspondientes a las uvas irradiadas durante 45 minutos para las distintas irradiaciones, resonante y no resonante.....</i>	96
Figura 3.26. <i>Evolución del contenido de trans-resveratrol en las uvas para las distintas irradiaciones, resonante y no resonante.....</i>	98
Figura 3.27. <i>Resultados correspondientes al experimento a temperatura ambiente. De superior a inferior: blanco; racimo con aplicación de disolución etanólica al 5% en agua; racimo con aplicación del extracto al 5% en agua.....</i>	101

Figura 3.28. Resultados correspondientes al experimento a 8°C. De superior a inferior: blanco; racimo con aplicación de disolución etanólica al 5% en agua; racimo con aplicación del extracto al 5% en agua.....	102
---	-----

## RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ACOPLADAS CROMATOGRAFÍA.

Figura 4.1. Espectro de absorción correspondiente a las moléculas de fenol, benceno, tolueno y trans-estilbeno.....	105
Figura 4.2. Cromatograma de trans-estilbeno obtenido a partir de una disolución de 50 µg/mL de trans-estilbeno en metanol.....	107
Figura 4.3. Cromatograma correspondiente a una mezcla trans-estilbeno y fenol en metanol..	108
Figura 4.4. Cromatograma correspondiente a la mezcla fenol, benceno, tolueno y trans-estilbeno.....	112
Figura 4.5. Elución de moléculas y caracterización por tiempo de vuelo según la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	114
Figura 4.6. Experimento de repetibilidad para la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	117
Figura 4.7. Experimento de reproducibilidad para la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	119
Figura 4.8. Experimento de linealidad para la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	120
Figura 4.9. Cálculo de la exactitud para la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	122
Figura 4.10. Cálculo del límite de detección por la técnica GC-REMPI-TOFMS.....	123
Figura 4.11. Cromatograma obtenido para las condiciones experimentales del trans-estilbeno en la inyección de 1 µL de extracto de uva.....	125



Figura 4.12. <i>Espectro de masas para <math>t_d</math> característico del trans-estilbeno procedente de 63 promedios para una muestra natural de piel de uva</i> .....	127
---	-----

## DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Figura 5.1. <i>Comparación de las desorciones delanteras con diferentes vástagos para una muestra de 3 <math>\mu</math>g de trans-resveratrol</i> .....	129
---	-----

Figura 5.2. <i>Espectros REMPI para la molécula de trans- resveratrol, obtenidos por LD-REMPI-TOFMS para las configuraciones trasera (espectro anterior) y Delantera (espectro actual)</i> .....	132
--	-----

Figura 5.3. <i>Resolución obtenida para la molécula de trans-resveratrol haciendo uso de la técnica de haces moleculares</i> .....	134
--	-----

Figura 5.4. <i>Espectro REMPI para la molécula de trans-resveratrol del intervalo 300,8-302,3 nm obtenido por medio de la máquina de Haces Moleculares</i> .....	135
--	-----

Figura 5.5. <i>Comparación de las bandas de la molécula de trans-resveratrol obtenida con las diferentes técnicas LD-REMPI-TOF (superior) y Máquina de Haces Moleculares (inferior)</i> ...137
--

Figura 5.6. <i>Frecuencia de torsión del grupo fenilo en torno al doble enlace del grupo vinilo</i> ..138
---

Figura 5.7. <i>Espectro IR del trans-estilbeno 3150-550 <math>\text{cm}^{-1}</math> corregido por línea base de 20 puntos</i> .....	142
---	-----

Figura 5.8. <i>Superior: Espectro IR del trans-estilbeno 3150-2750 <math>\text{cm}^{-1}</math>. Tensiones C-H de anillo bencénico y de C=C. Inferior: Espectro IR del trans-estilbeno 2000-1650 <math>\text{cm}^{-1}</math>. Patrón de sobretonos y bandas de combinación del benceno monosustituido</i> .....	143
--	-----

Figura 5.9. <i>Superior: Espectro IR del trans-estilbeno 1650-1250 <math>\text{cm}^{-1}</math>. Región de tensión del anillo, tensiones C=C y flexiones C-H en el plano. Inferior: Espectro IR del trans-estilbeno 1250-700 <math>\text{cm}^{-1}</math>. Flexiones y torsiones fuera del plano</i> .....	144
--	-----

Figura 5.10. <i>Superior: Espectro IR del trans-resveratrol 4000-450 cm<sup>-1</sup>, corregido el fondo por línea base. Inferior: Espectro IR del trans-resveratrol 3800-2200 cm<sup>-1</sup> tensiones C-H de anillo bencénico y de C=C, corregido el fondo por línea base.....</i>	147
Figura 5.11. <i>Superior: Espectro IR del trans-resveratrol 2000-1650 cm<sup>-1</sup>: patrón de sobretonos y bandas de combinación de los benceno para y 1,3,5- sustituidos. Inferior: Espectro IR del trans-resveratrol 1650-1250 cm<sup>-1</sup>: región tensiones C=C y flexiones C-H en el plano.....</i>	148
Figura 5.12. <i>Superior: Espectro IR del trans-resveratrol 700-450 cm<sup>-1</sup>: flexiones y torsiones fuera del plano. Inferior: Espectro IR del trans-resveratrol 1255-700 cm<sup>-1</sup>: flexiones y torsiones fuera del plano.....</i>	149
Figura 5.13. <i>Masas reducidas del trans-resveratrol y trans-estilbeno en el modo torsional en torno al fenilo.....</i>	151
Figura 5.14. <i>Superior: Espectro para la piel de uva obtenido por la técnica LD- REMPI-TOFMS. Inferior: Espectro para la bistorta obtenido por la técnica LD- REMPI-TOFMS.....</i>	154
Figura 5.15. <i>Cálculo del límite de detección por la técnica GC para la inyección de 50 µg/mL de trans-estilbeno.....</i>	169
Figura 5.16. <i>Espectro de tiempo de vuelo para el tolueno obtenido por medio de la técnica GC- REMPI-TOFMS.....</i>	172
Figura 5.17. <i>Espectros de masas obtenidos por medio de la técnica GC-REMPI-TOFMS, para las diversas sustancias señaladas en cada espectro.....</i>	174
Figura 5.18. <i>Reacción en la columna entre el fenol y la fase estacionaria.....</i>	177
Figura 5.19. <i>Relación señal/ruido para la molécula de trans-estilbeno obtenido por cromatografía de gases procedente de una matriz de piel de uva1.....</i>	179
Figura 5.20. <i>Valores del ruido para los espectros de las distintas moléculas obtenidos por las técnica GC-REMPI-TOFMS.....</i>	181

Figura 5.21. <i>Cálculo del límite de detección por la técnica LD-REMPI-TOFMS para la molécula de trans-estilbeno</i> .....	183
---	-----

## ÍNDICE DE TABLAS.

## SISTEMA EXPERIMENTAL

Tabla 2.1. <i>Parámetros de voltaje teóricos obtenidos por el programa SIMION v7.0</i> .....	27
Tabla 2.2. <i>Voltajes experimentales empleados en el sistema de placas aceleradoras y de detección</i> .....	30
Tabla 2.3. <i>Caudales de los diferentes gases del sistema cromatográfico</i> .....	34
Tabla 2.4. <i>Dimensiones de los tubos constitutivos de la interfaz entre las técnicas</i> .....	41
Tabla 2.5. <i>Condiciones experimentales de la rampa de temperatura programada elegida para la molécula de trans-estilbeno</i> .....	44
Tabla 2.6. <i>Voltajes empleados en los experimentos con la máquina de Haces Moleculares</i> .....	48
Tabla 2.7. <i>Retrasos empleados en los experimentos con la máquina de Haces Moleculares</i> .....	49

## RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.

Tabla 3.1. <i>Composición de la pastilla a analizar por la máquina de Haces Moleculares</i> .....	61
Tabla 3.2. <i>Gradiente lineal empleado en la separación de trans-resveratrol en hoja de vid</i> .....	71
Tabla 3.3. <i>Principales parámetros analíticos en el análisis de trans- resveratrol en extractos de hoja de vid</i> .....	74
Tabla 3.4. <i>Comparación de los principales parámetros analíticos en el análisis de trans-resveratrol en extractos de hoja de vid para las técnicas RP-HPLC y LD-REMPI-TOFMS</i> .....	76
Tabla 3.5. <i>Parámetros enológicos en el vino obtenido de las uvas tratadas (vino experimental) y el vino de control. El análisis fue llevado a cabo un mes después de la fermentación maloláctica</i> ....	82
Tabla 3.6 <i>Características físico-químicas de la variedad Cardinal tratada con 20% de CO<sub>2</sub></i>	

<i>y almacenadas a 20 °C.....</i>	<i>86</i>
-----------------------------------	-----------

<i>Tabla 3.7. Condiciones de gradiente empleadas en la separación de trans-resveratrol en los extractos de piel de uva.....</i>	<i>94</i>
---	-----------

<i>Tabla 3.8. Concentración de trans-resveratrol en las muestras analizadas por RP-HPLC.....</i>	<i>97</i>
--	-----------

## **RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ACOPLADAS A CROMATOGRAFÍA.**

<i>Tabla 4.1. Valores de masa y densidad de las moléculas que se van a analizar.....</i>	<i>105</i>
--	------------

<i>Tabla 4.2. Rampa de temperatura para el trans-estilbeno con <math>T_{\text{inyector}} = 260\text{ °C}</math> y <math>T_{\text{detector}} = 290\text{ °C}</math>.....</i>	<i>107</i>
---	------------

<i>Tabla 4.3. Parámetros cromatográficos obtenidos para el sistema fenol y trans-estilbeno.....</i>	<i>109</i>
---	------------

<i>Tabla 4.4 Contenido del recipiente de mezcla para el análisis por GC- REMPI-TOFMS.....</i>	<i>110</i>
---	------------

<i>Tabla 4.5. Caracterización cromatográfica por tiempos de elución de los compuestos de la mezcla.....</i>	<i>112</i>
---	------------

<i>Tabla 4.6. Tiempos de recorrido desde la elución hasta la ionización.....</i>	<i>113</i>
--	------------

## **DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

<i>Tabla 5.1. Comparación de las características espectrales en el análisis de la misma cantidad de compuesto con vástagos diferentes.....</i>	<i>131</i>
--	------------

<i>Tabla 5.2. Parámetros experimentales en la obtención del espectro REMPI de la molécula de trans-resveratrol por la técnica LD-REMPI-TOFMS.....</i>	<i>133</i>
---	------------

Tabla 5.3. <i>Comparación de los espaciados vibracionales entre las moléculas de trans-estilbeno y trans-resveratrol</i> .....	139
Tabla 5.4. <i>Tabla de caracteres del grupo puntual <math>C_s</math></i> .....	140
Tabla 5.5. <i>Representación irreducible para la molécula de trans-resveratrol</i> .....	140
Tabla 5.6. <i>Comparación de los valores experimentales de las frecuencias de vibración del trans- estilbeno con los valores bibliograficos para el trans-estilbeno y cis estilbeno</i> .....	145
Tabla 5.7.- <i>Comparación de posiciones, en <math>cm^{-1}</math>, medidas en espectros IR de trans- resveratrol y trans-estilbeno</i> .....	150
Tabla 5.8. <i>Comparación de algunas fuerzas de enlace entre las moléculas de trans-estilbeno y trans-resveratrol</i> .....	152
Tabla 5.9. <i>Correspondencia de las frecuencias de torsión entre los valores experimentales obtenidos para la molécula de trans-estilbeno y su valor para la molécula de trans-resveratrol</i> .....	153
Tabla 5.10. <i>Tiempos teóricos y calculados de la incidencia láser</i> .....	164
Tabla 5.11. <i>Valores de potencias incidentes para cada tiempo de exposición real</i> .....	165
Tabla 5.12. <i>Comparación de las masas obtenidas en el proceso de calibración con las masas reales tabuladas</i> .....	175
Tabla 5.13. <i>Intervalo de masas aceptado a partir de las masas tabuladas para el TOF-MS</i> .....	175
Tabla 5.14. <i>Resumen de los valores obtenidos de los experimentos de validación del sistema GC-REMPI-TOFMS para la determinación de trans-estilbeno</i> .....	178
Tabla 5.15. <i>Comparación de los límites de detección según la técnica empleada para el trans-estilbeno</i> .....	184

Tabla 5.16. <i>Comparación de la resolución obtenida por las diferentes técnicas para el compuesto de trans-estilbeno</i> .....	185
---	-----



## **SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.**

## **TÉCNICAS INDIVIDUALES**

CE: Electroforesis Capilar.

$^{252}\text{Cf}$ -PD: Desorción de plasma por isótopo californio 252.

FAB: Bombardeo atómico rápido.

FT-IR: Espectroscopia de IR por Transformada de Fourier.

GC: Cromatografía de gases.

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

LDI: Desorción e ionización láser.

MALDI: Desorción e Ionización Láser asistida por matriz

SRM: Seguimiento de reacción selectiva.

## **PROCESOS FÍSICOS**

EI: Ionización por impacto electrónico.

LD: Desorción Láser.

MPI: Ionización Multifotónica.

REMPI: Ionización Multifotónica Resonante.

## **DETECTORES.**

ECD: Detección por captura electrónica.

FID: Detector de Ionización de llama.

ICR: Resonancia Ciclotónica de Iones.

MS: Espectrómetro de masas.

TOFMS: Espectrometro de Masas por tiempo de vuelo.

## **ABREVIATURAS**

A: area.

AISI: American Iron and Steel Institute.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

D<sub>i</sub> : Diámetro interno.

D<sub>e</sub> : Diámetro externo.

E<sub>d</sub> : Energía de desorción.

E<sub>i</sub> : Energía de ionización.

FWHM: Full Weight Half Médium.

IP: Instituto Pluridisciplinar.

L: Longitud.

LoD: Límite de detección.

LoQ: Límite de cuantificación.

M: masa

MCP: Micro Chanel Plates (placas microcanales)

N: noise (ruido)

P: Potencia

Q: Caudal

S: Signal (señal)

STS: Enzima estilbeno sintasa.

t: tiempo.

T: temperatura

u.arb: Unidades arbitrarias.

UCM: Universidad Complutense de Madrid.

ULHM: Unidad de Láseres y Haces Moleculares.

V: Voltaje.

[ ]: Concentración.

$\lambda$ : Longitud de Onda.

$\nu$ : Número de Ondas.

$\rho$ : Densidad

## **UNIDADES Y MÚLTIPLOS**

En caso de no indicarse lo contrario, las unidades empleadas en esta tesis doctoral corresponden al SI.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

## 1.1. ANTECEDENTES

Son muchos los sistemas que se han venido empleando en la detección y análisis de sustancias a lo largo del tiempo: los sistemas cromatográficos, de espectroscopia de masas de cuadrupolo, de tiempo de vuelo etc. El formato de presentación de los resultados puede variar de un sistema a otro, valga como ejemplo que en todos los sistemas cromatográficos el pico de señal viene representado por un tiempo característico de elución y su posterior asignación a un compuesto determinado depende de lo extensa que sea la biblioteca de compuestos identificados hasta la fecha. Por su parte en sistemas que emplean para la detección tiempos de vuelo la señal puede presentarse en un formato temporal de aparición del pico de señal, existiendo una dualidad entre el tiempo de aparición y su correspondiente masa gracias a las expresiones matemáticas que relacionan los tiempos de aparición con su masa<sup>1</sup>.

El principal problema que presenta el empleo de la GC como técnica exclusiva de análisis, es que sustancias con elevado momento bipolar, y por consiguiente elevado punto de evaporación, al ser sometidas a elevadas temperaturas en su proceso de evaporación pueden sufrir descomposición térmica produciéndose, con ello, una disminución en la intensidad de señal así como fragmentos que falseen la medida de otros compuestos e introduzcan un aumento en el ruido de la señal. Por lo tanto, para este tipo de sustancias, se debe de hacer uso de técnicas de derivación con el fin de aumentar la volatilidad de los compuestos por la introducción en su estructura molecular de moléculas que rebajen la polaridad de la sustancia en cuestión y poder asegurar de esa manera la ausencia de fragmentación antes de llegar a la detección<sup>2,3</sup>, estabilizar compuestos térmicamente lábiles, mejorar la detección<sup>4</sup> y reducir la complejidad de la muestra<sup>5,6</sup>. Otra de las problemáticas que presenta la cromatografía de gases es que independientemente del modo de trabajo que se elija, isotérmico o con rampa programada de temperatura, cuando se alcanzan elevadas temperaturas en la columna se produce un *sangrado* característico en la misma, procedente del desprendimiento de moléculas que recubren la fase sólida de la columna, que resultará en mayor o menor intensidad en función del tipo de columna con la que se este trabajando. Este hecho puede llegar a ser una fuente considerable de ruido para sustancias que eluyan a elevadas temperaturas; puede ser eliminado restándole a la señal el debido a este sangrado, que es un caso análogo al dado en el caso del sangrado del septum y la grasa de silicona<sup>7,8</sup>.

Los problemas anteriores se pueden ver subsanados con el empleo de la técnica de HPLC, que es una de las más empleadas en la actualidad<sup>9</sup>. Al trabajar en condiciones distintas a como lo hace la GC se puede decir que son dos técnicas complementarias presentando la señal en el mismo formato.

Según se ha comentado uno de los problemas que presentan los sistemas en los que la caracterización de los picos se hace exclusivamente en función del tiempo de elución es que la potencia de identificación y asignación está supeditada a la biblioteca de compuestos existente hasta el momento. Ante esta necesidad, surgieron los MS<sup>10</sup> cuya estructura general consistía en una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que debe de operar en condiciones de bajo vacío. Se deben separar los pasos de la introducción de la muestra, evaporación y sucesiva ionización o desorción/ionización respectivamente. Con el tiempo este tipo de detectores se han visto sustancialmente mejorados.<sup>11,12</sup> Si bien las técnicas cromatográficas presentan la ventaja de separar los componentes presentes en una muestra como función de su tiempo de elución, los espectrómetros de masas proporcionan información característica en relación a las propiedades másicas de los componentes presentes en la muestra, esto es, mientras que la cromatografía distingue a las sustancias por su tiempo de retención, los MS los aísla por masas<sup>13</sup>.

Uno de los MS que con más éxito se ha implantado tanto en la comunidad científica como en el mercado han sido los TOFMS<sup>14</sup>. La resolución del TOFMS está fundamentalmente determinada por la distribución temporal y espacial de iones<sup>15</sup>, aspecto que le confiere a esta técnica una gran universalidad, dado que el rango de masas a analizar se puede ver sustancialmente ampliado variando la longitud del tubo<sup>16,17</sup>.

El hecho de que cada técnica presente una serie de ventajas por separado ha llevado desde el comienzo a plantearse el acoplamiento de técnicas con el fin de que resulte una sinergia de dicha interacción y es en este punto donde reside la auténtica potencia de las técnicas anteriores, esto es, una combinación de técnicas provocaría una mejora sustancial que el resultado obtenido por cada una de ellas de manera individual<sup>18</sup>.

El primer acoplamiento entre técnicas se dio entre el GC y el MS<sup>19</sup>. El inicio de la GC-MS se inicia con Gohlke, RS<sup>20</sup>. Dicha unión entre el acoplamiento de un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas es extremadamente útil en el estudio de productos

naturales donde uno puede encontrar mezclas complejas que contienen componentes trazas que son difíciles de aislar e identificar debido a que con dicho acoplamiento se pueden asignar picos que no quedan resueltos cromatográficamente.

Los resultados derivados de dicho acoplamiento GC-MS han resultado ser muy satisfactorios y por consiguiente ha sido empleado por múltiples investigadores en una amplia variedad de diferentes campos de aplicación, incluyendo aplicaciones ambientales<sup>21,22</sup>. Actualmente con la GC-MS se han logrado configuraciones que proporcionan un ahorro de tiempo en el análisis de las mezclas<sup>23,24</sup>.

La mejora observada en la detección y análisis, producto de la sinergia conjunta de las técnicas que se acoplan, ha suscitado el acoplamiento entre las múltiples técnicas existentes en el mercado. Dada la complejidad de disponer de una técnica universal de detección y análisis partiendo del acoplamiento entre técnicas, han sido muchos los temas relacionados con la detección y caracterización por masas teniendo cada uno características particulares<sup>25</sup>. No es una pretensión el nombrarlos todos, ni establecer una rigurosa comparación entre los mismos pero si dar una visión general de la evolución y mejora que introducen las técnicas acopladas en el campo del análisis.

En este sentido dentro de un sistema acoplado se puede mejorar el conjunto por mejora de cada uno de sus componentes individuales, así la etapa de separación se puede ver mejorada por el acoplamiento de sucesivas columnas cromatográficas, de este modo técnicas como GC×GC/TOFMS son tremendamente selectivas<sup>26</sup> en el caso de los MS se procede al acoplamiento de varios MS en lo que se conoce como acoplamiento en tándem<sup>27</sup>, de esta manera se puede disponer de una herramienta muy precisa en la caracterización de vías de fragmentación de las moléculas así como de procesos intramoleculares, de modo que aumentando el número de etapas de cada una de las partes, el proceso quedará registrado de forma más precisa<sup>28</sup>.

Con el tiempo, el número de técnicas ha ido aumentando enormemente por lo que elegir una técnica concreta como la más versátil es difícil, si bien, se puede elegir en función de las necesidades concretas en cada caso. Valga como ejemplo el hecho de que la técnica HPLC-MS<sup>29,30</sup> presenta dificultad en la identificación de compuestos desconocidos y la dificultad en la cuantificación de analitos específicos en muestras complejas<sup>31</sup>. Sugerencias a



la solución de este problema ha pasado por el uso de espectrometría de masas en tándem y mejorar las separaciones cromatográficas y la limpieza de la muestra.

Así pues, técnicas tales como GC-MS, HPLC-MS, CE-MS y MS-MS son excelentes para dar una visión de conjunto del contenido en una muestra, pero cuando se les quiere proporcionar mayor selectividad se procede a acoplamientos en tándem GC-MS-MS<sup>32</sup>, de modo que en este caso GC-MS-MS ha demostrado ser una técnica más potente en casos concretos que la GC-ECD<sup>33</sup>. Si se desea disponer de métodos en la detección de muestras más pesadas se debe recurrir a técnicas como HPLC-MS-MS<sup>34</sup>.

En el caso de querer estudiar muestras muy polares por medio de las técnicas acopladas, se debe recurrir al uso de HPLC-MS o de una derivación eficaz combinada con GC-MS para su análisis, de esta forma nos encontramos con ventajas y desventajas entre los métodos GC-MS y HPLC-MS de modo que la técnica HPLC-MS ha mostrado una mejor reproducibilidad que los métodos de derivación-GC-MS<sup>35</sup>, de hecho el análisis de compuestos extremadamente polares no funciona todo lo bien que debiera debido a una derivación incompleta en determinados casos.

En muchas ocasiones la complejidad de la muestra lleva asociada una importante inversión de tiempo en su preparación y acondicionamiento mediante procesos de purificación y extracción antes de proceder a la determinación final por varios métodos de detección usados (GC, HPLC, HPLC-MS, GC-MS...), siendo esta la principal fuente de error en las modernas técnicas de análisis.

Como medida para la disminución del tiempo en el proceso de preparación de la muestra, se han desarrollado los métodos GC-MS de análisis rápido para la medida de compuestos orgánicos; como pesticidas, ácidos y fármacos<sup>36</sup>, en el caso de que la muestra presente compuestos más volátiles se hace uso del método rápido GC-TOFMS desarrollado para el análisis de compuestos orgánicos volátiles<sup>37</sup> y la técnica HPLC-TOFMS<sup>38</sup> que resulta tremendamente útil en la asignación de masas exactas en las medidas de confirmación de pesticidas y herbicidas, llegándose a obtener resoluciones entre 3500 y 5000 umas.

Cuando lo que se desea es un análisis de mezclas muy complejas, se hace uso de la técnica FT-ICR-MS, empleada en la separación de crudo de aceite<sup>39</sup>, residuos explosivos<sup>40</sup> y toda una serie de muestras de extrema complejidad.

El avance y mejora de una técnica no solamente se debe a mejorar el proceso de homogeneización y acondicionamiento de la muestra a lo largo de todo su recorrido dentro del sistema, sino también al mecanismo de ionización de las moléculas presentes dado que una mala ionización redundará en una mala señal del analito. En este sentido se han ido desarrollado múltiples sistemas de análisis atendiendo a la forma de producción y detección de iones, como las basadas en procesos de fragmentación característicos SRM<sup>41</sup>.

## **1.2. INCORPORACION DEL LÁSER A LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS.**

Con el advenimiento del láser los procesos de ionización se vieron enormemente mejorados lo que originó el surgimiento de nuevas técnicas y mejora de las existentes en lo que a procesos de desorción e ionización de la muestra se refiere. En un principio, antes de la llegada de pulsos ultracortos, existían técnicas que podían competir con la ionización láser. Un claro ejemplo reside en las técnicas de análisis de trazas tales como LDI<sup>42</sup> con la que se obtenían muy buenos resultados para sales orgánicas de bajo peso molecular<sup>43</sup> pero costaba un gran esfuerzo para obtener espectros útiles de biomoléculas<sup>44</sup>, concretamente cuando la masa de los analitos se aproxima a 1000 uma<sup>45</sup>. De este modo, a finales de la década de los 80, las técnicas FAB<sup>46</sup> y <sup>252</sup>Cf-PD<sup>47</sup> resultaron ser más efectivas que la LDI en la generación de buenos espectros de masas procedentes de muestras naturales.<sup>48</sup>

La llegada de pulsos ultracortos y del láser sintonizable ha dado lugar a una de las técnicas de ionización más versátiles que existen en la actualidad: la técnica REMPI cuyo éxito radica en la forma de ionizar. Es conocido que un proceso de absorción multifotónica puede, en principio, transcurrir a través de niveles reales o de niveles virtuales de la molécula. La vida media de un nivel virtual está en torno a  $10^{-15}$  segundos, mientras que la de un nivel real lo está en torno a  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  segundos. Por este motivo, la probabilidad de absorción de más de un fotón es mayor si se hace a través de un estado real, conociéndose dicho proceso como REMPI, frente a la MPI que transcurre a través de estados virtuales. Esta mayor probabilidad de absorción hace que mientras la irradiancia requerida en procesos MPI es del

orden de  $1 \text{ GW/cm}^2$ , para un proceso REMPI basta con irradiancias inferiores a  $1 \text{ MW/cm}^2$ . La menor irradiancia necesaria para producir el proceso de ionización, permite igualmente minimizar la fragmentación molecular durante dicho proceso.

La aplicación del proceso REMPI al TOFMS le confiere al espectro de masas una elevada selectividad y permite así obtener espectros de masas no congestionados y eliminar de forma importante las interferencias debidos a otros compuestos presentes en la matriz. La banda tan estrecha de la luz láser sólo puede ionizar aquellas especies que absorban los fotones de frecuencia específica. Se sabe que la EI es un método versátil para ionizar todo tipo de moléculas por lo que ha sido ampliamente usado en espectrómetros de masas convencionales<sup>49</sup>, el problema de usar EI en lugar de la técnica combinada REMPI-TOFMS es cómo generar un pulso estrecho de haces electrónicos de elevada intensidad. Esto hace que la técnica REMPI-TOFMS sea una técnica tremendamente selectiva. Debido a esto, la ionización REMPI ha sido ampliamente usada en la ionización con detección de TOFMS, dado que una técnica MPI<sup>50</sup>, podría generar espectros de masas congestionados debido a múltiples interferencias de masas<sup>51</sup>.

Haciendo uso de la técnica REMPI-TOFMS debido a su elevada resolución temporal, se pueden obtener trazas presentes en una matriz. La técnica REMPI-TOFMS no solamente proporciona una elevada resolución temporal sino una gran rapidez de colección de espectros lo cual le confiere una potencia adicional sobre el resto de los detectores de masas que se pone de manifiesto en acoplamientos a mayor escala. Valga como ejemplo que el más común de los espectrómetros de masa para GC han sido instrumentos cuadrupolares, para los cuales la velocidad de escaneo no es lo suficientemente rápida<sup>52</sup> como para usarse como un detector en GC×GC en cuyo caso, hay que hacer uso de un escaneo limitado en masas. Por ello, los TOFMS que son capaces de almacenar 500 espectros completos se ajustan perfectamente<sup>53,54</sup> al GC×GC. Por tanto, el sistema REMPI-TOFMS es un excelente sistema de ionización selectivo así como un excelente sistema de colección de los iones producidos.

La gran selectividad del análisis por REMPI-TOFMS está dada por la combinación de la detección selectiva de masas con un proceso de ionización resonante: la ionización se produce por absorción coherente de varios fotones láser. Así, para una ionización eficaz, la energía del primer fotón debe ser resonante con uno de los estados reales de la molécula. Esta condición provoca una segunda selectividad a la muestra: ionización por longitud de onda

selectiva. Además, otras claras ventajas de la REMPI-TOFMS son las siguientes: la gran sensibilidad y resolución, una mayor eficacia de la ionización, un fácil control de la fragmentación molecular por la intensidad del láser y la posibilidad de análisis simultáneos de diferentes componentes presentes en la matriz. Como resultado, esta técnica está bien consolidada para análisis espectroscópicos, así como para la investigación fundamental<sup>55-59</sup> o aplicaciones donde es necesario el análisis muy sensible de trazas de componentes en una matriz compleja o análisis simultáneo de un gran número de componentes sobre un amplio intervalo de concentraciones<sup>60-66</sup>.

Análogamente, con la llegada de pulsos ultracortos, el láser no solamente se empleó como técnica de ionización sino también como técnica de desorción con excelentes resultados, valga como ejemplo la técnica MALDI<sup>67</sup>, se puede decir que la técnica MALDI representa una de las principales herramientas analíticas en la bioquímica moderna<sup>68</sup> y ciencia de los polímeros<sup>69</sup>. Tanto la técnica LDI, como la técnica MALDI hacen uso de la absorción de la luz láser por una película sólida. La energía tomada de la radiación láser origina la evaporación y la ionización de la muestra.

Cuando la desorción láser se aplica conjuntamente con la ionización selectiva REMPI-TOFMS, surge la técnica LD-REMPI-TOFMS.<sup>70</sup> Esta técnica, de esta forma concebida, permite el análisis de compuestos térmicamente inestables: ya de por sí la desorción láser favorece la vaporización sobre la fragmentación térmica<sup>71</sup>, si a este hecho se le suma que se desorbe la muestra con pulsos láser de 4-5 ns de duración da como resultado que en el proceso de desorción prácticamente no se pierde muestra por fragmentación térmica. Para que la desorción láser resulte lo más eficaz posible es necesario controlar cuidadosamente la energía del láser de desorción, pero de forma general se puede decir que usando densidades de potencia por debajo de  $10^6 \text{ Wcm}^{-2}$  la desorción se produce sin fragmentación molecular.<sup>72</sup> La expansión subsiguiente a la desorción, provoca una congelación de los movimientos vibro-rotacionales lo que origina que se disponga de unas bandas muy bien resueltas y evita que tenga lugar una fragmentación durante el proceso de viaje hasta la zona de ionización. La otra ventaja de la LD, especialmente cuando se combina con la selectividad del REMPI, es la simplicidad de la preparación de la muestra, que en otras técnicas llega a ser tediosa, lo que facilita el análisis, eliminando complejos protocolos que consumen un exceso de tiempo y recursos y por consiguiente se disminuyen posibles fuentes de error.

El hecho de darse una separación física entre los procesos de desorción e ionización selectiva para la técnica LD-REMPI-TOFMS, ha permitido que ambos puedan ser optimizados por separado: el láser es una inmejorable herramienta en los procesos de desorción de muestra, pero dicho proceso de desorción puede verse mejorado por la introducción de compuestos dentro de la propia matriz de desorción. Dichos compuestos pueden ser absorbentes de radiación de modo que hacen que la absorción de la luz láser sea más eficaz y al aplicarse a la técnica TOFMS<sup>73</sup> es capaz de proporcionar espectros de proteínas de aproximadamente 100,000 uma. En el caso de la técnica LD-REMPI-TOFMS ha demostrado que el proceso de desorción mejora por la introducción en la matriz de elementos metálicos<sup>74</sup>.

Todos los aspectos señalados anteriormente hacen que de la combinación de la LD con la REMPI acoplada a la TOFMS surja una técnica extraordinaria de análisis selectivo de trazas de compuestos en matrices complejas<sup>75-81</sup>. Las principales ventajas de esta técnica son la ionización selectiva de componentes minoritarios en una matriz compleja, su gran sensibilidad y resolución lo que deriva en una ionización más eficaz. Esta combinación de factores hace que la técnica LD-REMPI-TOFMS no sólo proporcione una información muy valiosa a nivel espectroscópico del compuesto en cuestión sino que sea una herramienta esencial en el análisis de trazas en el ámbito analítico<sup>82-88</sup>.

### **1.3. METAS Y OBJETIVOS DE LA TESIS.**

Los primeros resultados que se presentan en esta tesis se han obtenido haciendo uso de la técnica LD-REMPI-TOFMS, para ello, continuando con los estudios<sup>89,90</sup> que se han venido realizando en la ULHM del IP en los últimos años, se ha seguido con el estudio de la molécula de trans-resveratrol como molécula de análisis dada su importancia biológica. El trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) ha sido identificado como un constituyente de muchas especies de plantas, además de la *Vitis vinifera*<sup>91,92</sup>. Se acumula en hojas de vid y piel de uva como respuesta a diversos organismos fúngicos, radiación UV, o productos químicos<sup>93,94</sup> y se ha encontrado en vinos en concentraciones que dependen de las prácticas vinícolas y enológicas<sup>94,95</sup>. El interés analítico en el trans-resveratrol se debió en un primer momento a sus propiedades naturales como pesticida: cuantitativamente, el mayor componente fitoalexínico de la uva como respuesta a agentes fúngicos es el trans-resveratrol,

que ha demostrado ser fungitóxico a concentraciones fisiológicas contra la *Botrytis cinerea*<sup>96</sup> (el principal patógeno de la uva). Además, se ha demostrado que es antifúngico contra otros patógenos como *Plasmopara viticola*<sup>97</sup>, *Phomopsis viticola*<sup>98</sup> o *Rhizopus stonifer*<sup>99</sup>. El trans-resveratrol es una de las mayores fitoalexinas de la familia de los estilbenos encontradas en diferentes familias de plantas tales como el *Polygonum Cuspidatum* (Bistorta del Japón), una planta medicinal china, cuyos extractos contienen trans-resveratrol. También, cacahuates y sus productos son considerados las mayores fuentes de trans-resveratrol<sup>100</sup>.

En el caso concreto de la uva, su resistencia a las infecciones fúngicas ha sido explicada mediante diversos mecanismos. Entre ellos uno de los más importantes es la producción de metabolitos secundarios que contribuyen de una u otra forma a aumentar la resistencia de las plantas<sup>101,102</sup>. Dichos compuestos pueden estar presentes en la planta previamente o bien sintetizarse como respuesta a la infección. En ambos casos, los compuestos secundarios más importantes sintetizados en la vid son de tipo fenólico, principalmente estilbenos (resveratrol, piceid, pterostilbeno,  $\epsilon$ -viniferina, etc.) y flavonoides (taninos, catequina, epicatequina, quercetina, antocianinos, etc.), etc. Diversos estudios permiten asegurar que dichos compuestos fenólicos en la vid son de gran importancia en el sistema de defensa de la planta frente a las infecciones<sup>103-105</sup>.

Además de este carácter antifúngico, el consumo de trans-resveratrol presenta grandes beneficios para el ser humano tales como la disminución de la deposición lipídica en el hígado, evita la formación de trombos, promueve la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y protege contra enfermedades cardiovasculares<sup>106,107</sup>. A lo que hay que sumar su capacidad quimiopreventiva en la prevención del cáncer<sup>108</sup> abriendo con ello una nueva vía para subsiguientes investigaciones<sup>109-111</sup>. Es más, el trans-resveratrol no deja de estar de actualidad en cuanto que da lugar a nuevas líneas de investigación<sup>112-114</sup> así como que se sigue descubriendo su presencia en determinados alimentos<sup>115</sup>. El que una molécula presente tantos beneficios para la salud ha hecho que se planteen métodos para establecer su contenido en productos en los que está presente dicho compuesto.

El análisis del trans-resveratrol se lleva a cabo de manera general por métodos cromatográficos: GC<sup>116,117</sup> y HPLC<sup>118-120</sup> o CE.<sup>121,122</sup> Aparte de la propia técnica de separación, su análisis en uvas y vinos requiere del uso de preconcentración previa de la

muestra o técnicas de extracción con mezclas de disolventes debido a la complejidad de las matrices y de la baja concentración de analito. Las técnicas generalmente empleadas son extracción líquida con solventes orgánicos o extracción en fase sólida; para el análisis por GC se requiere de la derivación.

Está generalmente aceptado que la preparación de muestra es la etapa limitante en el análisis del trans-resveratrol, no sólo por el hecho de consumir recursos temporales sino por las fuentes de error introducidas con esta operación. Han existido muchas controversias entre diferentes laboratorios concernientes a las técnicas de preparación: la extracción en fase sólida disminuye las alturas y áreas de los picos,<sup>123</sup> usando extracciones en fase orgánica es inevitable el tener pérdidas significativas,<sup>124</sup> la pérdida de muestra de trans-resveratrol en rotavapor<sup>125</sup> etc. No hay que obviar el hecho de que cualquier método que requiera una preparación compleja de la muestra antes del análisis redundará en un consumo de tiempo y recursos que encarecen el análisis en cuestión además de ser una fuente notable de errores.

Diferentes revisiones de algunos de los métodos para el análisis de trans-resveratrol<sup>126-128</sup> muestran una gran diversidad en los valores publicados, que es atribuida a la posible isomerización durante el proceso de derivación, importantes pérdidas debido a la oxidación, isomerización o hidrólisis durante los procesos de separación y extracción<sup>129</sup>, y la presencia de algunos derivados de trans-resveratrol que pueden interferir en los resultados obtenidos. Para paliar los problemas que subyacen en el análisis de una molécula tan problemática como el trans-resveratrol se han desarrollado métodos en la determinación de trans-resveratrol por HPLC<sup>130</sup>.

En el caso del vino y muestras de zumo de uva, se han desarrollado diferentes métodos<sup>131-133</sup> para el análisis de trans-resveratrol por inyección directa en un sistema de HPLC, pero en la mayoría de los casos, esto proporciona cromatogramas muy complejos que en muchos casos no permiten una correcta identificación o cuantificación de los picos.<sup>121</sup> El análisis directo de trans-resveratrol en vinos también se ha desarrollado por electroforesis capilar pero con una falta de sensibilidad atribuida a la necesidad de preconcentración.<sup>125</sup>

La combinación de la desorción láser seguida de ionización multifotónica resonante y espectrometría de tiempo de vuelo ha permitido eliminar las fuentes de error mencionadas anteriormente. En el caso de compuestos como el trans-resveratrol, en las que al hecho de

presentar una baja presión de vapor se le suma el ser témicamente inestable, su análisis se vea fuertemente impedido por la aplicación de una fuente externa de calor. Para solventar este problema, se han desarrollado numerosas técnicas para muestras no volátiles<sup>134</sup>; entre ellas, una de las más avanzadas y apropiadas es la basada en la desorción láser seguida de ionización láser resonante acoplada con espectrometría de tiempo de vuelo.

Por otra parte, dado que el resveratrol presenta dos variedades isoméricas, de las cuales la que manifiesta todas las propiedades beneficiosas de las que se ha venido hablando es el isómero trans, cualquier información relativa al tránsito trans→cis puede redundar en una mejor comprensión del fenómeno de la isomerización. En este sentido, la parte espectroscópica de esta tesis ha pretendido profundizar en el mecanismo de isomerización del trans-resveratrol identificando el espaciado observado en el espectro REMPI a un movimiento molecular concreto para dicha molécula. Con el fin de disponer de una mayor información acerca de la espectroscopia REMPI para la molécula de trans-resveratrol se ha realizado un experimento paralelo en una máquina de haces moleculares<sup>135-137</sup>. El empleo de haces moleculares supersónicos es muy favorable ya que enfría los grados internos de rotación y vibración del producto neutro de desorción. El enfriamiento vibracional reduce la fragmentación de grandes moléculas y por otra parte el enfriamiento de los movimientos traslacionales disminuye la distribución de velocidades. Esto permite una más alta resolución en masas la cual puede ser aumentada haciendo uso de un espectrómetro reflector de tiempo de vuelo. Las condiciones presentes en dichos experimentos aseguran que los movimientos así detectados se han realizado en condiciones de baja energía con lo cual deben de corresponderse con movimientos precursores de la isomerización trans→cis.

Como resultado de la escasa información espectroscópica hasta el momento de escribir esta tesis acerca de la molécula de trans-resveratrol, se recurrió al estudio de otra molécula de gran parecido a la molécula de trans-resveratrol y es el trans-estilbeno (1,2-difeniletano) cuya fotoquímica ha sido el principal objeto de estudio de muchos grupos científicos<sup>138,139</sup>. Análogamente a como ocurre para la molécula de trans-resveratrol dispone de dos formas isoméricas y por consiguiente el disponer de una amplia información acerca de las propiedades del doble enlace C=C<sup>140</sup> da como resultado que el estudio espectroscópico de la molécula de trans-resveratrol se vea apoyado por el de otra molécula de similares características.



Debido a las condiciones experimentales de empleo de pulsos de pocos nanosegundos, los movimientos determinados por la espectroscopia REMPI se corresponden con tránsitos vibro-rotacionales. Por ello, es muy importante el documentar la molécula con las técnicas de análisis complementario que proporcionan información acerca de la estructura vibracional de la molécula. En este sentido, las actuales técnicas de FT-IR están a la vanguardia<sup>141</sup> en lo que a análisis infrarrojo se refiere. Por consiguiente, parte del capítulo dedicado a la espectroscopia va a estar dedicado a la caracterización de las bandas obtenidas por FT-IR para las moléculas de trans-resveratrol y trans-estilbeno.

Según se ha comentado, unas de las técnicas comúnmente empleada en el análisis del trans-resveratrol es la de HPLC dado que al operar a temperatura ambiente no supone ningún inconveniente para el análisis y detección de la molécula de trans-resveratrol. En este sentido, uno de los objetivos de esta tesis ha sido procurar la comparación<sup>142</sup> para una misma muestra entre las técnicas de HPLC y la relativamente reciente LD-REMPI-TOFMS con el fin de poder extraer una información directa acerca de la fidelidad del análisis de un compuesto tan complicado de analizar por otras técnicas como es la molécula de trans-resveratrol. Se ha elegido la técnica HPLC como técnica de comparación pues es la que puede proceder a un estudio comparativo lo más directo posible y la que se emplea usualmente en el análisis de trans-resveratrol. Debido a que los métodos basados en la GC-MS<sup>143</sup> para el caso concreto del trans-resveratrol presentan el inconveniente de la extracción, limpieza y reacción de derivación como pasos previos al análisis por GC y estos pasos pueden disminuir el contenido real de trans-resveratrol en la muestra por su isomerización a cis-resveratrol. Del resultado así obtenido se han podido derivar una serie de aspectos que de otra forma sólo podrían haberse estimado.

Las importantes actividades fisiológicas y biológicas del trans-resveratrol que se han venido comentado hasta el momento, han disparado un gran número de estudios enfocados a comprender el mecanismo que controla su concentración en vino<sup>97</sup>, así como los efectos beneficiosos para la salud en el consumo de vinos tintos<sup>144,145</sup>. En las uvas el trans-resveratrol se acumula fundamentalmente en la piel y en las semillas y se ha encontrado tanto en uvas rojas como blancas en un amplio intervalo de concentraciones dependiendo de la variedad de la uva, factores ambientales presentes en la cosecha, etc<sup>146,147</sup>. El trans-resveratrol se ha encontrado en vinos con un mayor contenido en vinos tintos que en vinos blancos o rosados, esta diferencia es debida a que el mosto está en contacto con el hollejo en la fermentación que

tiene lugar durante el proceso de vinificación, no obstante el contenido de trans-resveratrol en vinos es muy dependiente de las diferentes prácticas enológicas<sup>148-153</sup>. A diferencia de en la uva, en la que sólo se encuentra el isómero trans, en el vino aparecen ambos isómeros<sup>154,155</sup>.

En base a estos datos, se ha desarrollado un nuevo método de aumentar el contenido de trans-resveratrol en las uvas de mesa por aplicación de tratamientos anóxicos cortos<sup>156</sup>. Posteriormente dicho tratamiento se ha aplicado a uvas para vinificación, permitiendo la obtención de un vino enriquecido en trans-resveratrol<sup>157</sup>.

Uno de los métodos más ampliamente estudiados para inducir la producción de trans-resveratrol como respuesta a factores externos es la irradiación UV que ha sido estudiada tanto en uvas después de la cosecha como en plantas cultivadas *in vitro*<sup>158-162</sup>. Posteriormente, se ha investigado la obtención de vinos enriquecidos en trans-resveratrol tanto utilizando uvas sometidas a irradiación UV para la vinificación<sup>163</sup> como mediante la irradiación directa del vino<sup>164</sup>.

Una revisión de estos métodos permite observar una gran variabilidad en los resultados publicados en lo que respecta al factor de aumento en el contenido de trans-resveratrol que va de 1,5<sup>161</sup> a 50<sup>162</sup>. Esta gran variabilidad se puede atribuir a las diferentes condiciones en las que se realizaron los distintos experimentos, principalmente: diferentes variedades y grados de maduración de las uvas, diferentes tratamientos (longitud de onda, intensidad y tiempo de irradiación, distancia entre la fuente de luz y la muestra, etc.), diferentes condiciones y tiempo de almacenamiento entre la irradiación y el análisis, etc. Además, los métodos para analizar el contenido en trans-resveratrol en las uvas irradiadas también son diferentes, lo que también podría contribuir a la variabilidad observada en los resultados publicados como se ha demostrado previamente<sup>165</sup>.

Por otra parte, se ha estudiado igualmente la correlación entre la producción de trans-resveratrol inducida por la irradiación UV-C y la resistencia de las plantas a la *Botrytis Cinerea*<sup>166</sup> y a la *Rhizopus stolonifer*<sup>167</sup>. Se ha demostrado igualmente que la irradiación UV puede reducir la putrefacción después de la cosecha en uvas de mesa<sup>168</sup>, aunque en este trabajo solo se estudió la evolución temporal de las uvas tratadas y no se realizaron análisis químicos, es evidente la correlación existente entre la mejora de la resistencia natural de las

uvas observada y la inducción de la producción de trans-resveratrol demostrada por los autores anteriores.

Desde un punto de vista bioquímico, la vía de síntesis del trans-resveratrol en uvas está catalizada por la STS, habiéndose caracterizado varios tipos de genes de la STS en función de su expresión como respuesta a distintos estreses bióticos y abióticos. Desde este punto de vista, se ha demostrado igualmente que la inducción de la producción de trans-resveratrol en plantas de vid cultivadas *in vitro* e irradiadas con radiación UV se correlaciona directamente con la expresión del ARN-m de la STS inducida por dicha radiación<sup>169</sup>.

En esta tesis se ha dado un paso adelante en el proceso de elicitación de trans-resveratrol en la piel de la uva por irradiación UV que consiste en irradiar a diferentes longitudes de onda, de modo que una de ellas corresponda al máximo de absorción REMPI y la otra una longitud de onda para la que no presente absorción la molécula de trans-resveratrol. De esta forma, se ha logrado una elictación resonante para la molécula de trans-resveratrol contenida en la piel de la uva lo que puede suponer mejoras en lo que a tiempo y eficiencia para el mecanismo de elicitación se refiere.

Uno de los objetivos de esta tesis no solamente ha sido el aumentar el contenido endógeno de trans-resveratrol en la piel de la uva sino la búsqueda de otros medios que permitan obtener una mejora sustancial en la conservación de las uvas y otros frutos. En este sentido, el almacenamiento a baja temperatura es una de las tecnologías más eficaces con el fin de aumentar la durabilidad después de la cosecha en frutas y vegetales. De cualquier modo, en uvas de mesa el almacenamiento a baja temperatura está limitado por su elevada sensibilidad al ataque fúngico, principalmente a la *Botrytis cinerea*. Este patógeno, el cual presenta un impacto económico considerable en horticultura, está usualmente controlado por medios anti-fúngicos, pero esto puede conllevar una gran resistencia a la población patógena<sup>170</sup>. Más aún, debido a que los tratamientos químicos post-cosecha están siendo restringidos en la mayoría de los países, resulta necesario el empleo de tratamientos alternativos que sustituyan a los tratamientos químicos en cuanto a la preservación de la calidad de las frutas y protección frente ataques fúngicos se refiere. En este sentido, la aplicación de una atmósfera controlada bajo un flujo continuo de gas inerte ha demostrado ser beneficiosa en el control de las enfermedades post-cosecha en uvas de mesa durante largos

periodos de almacenamiento en frío<sup>171</sup>, no obstante se impuso una limitación al almacenamiento prolongado en condiciones de atmosfera controlada<sup>172,173</sup>.

Por todo lo anterior, un tratamiento alternativo pudiera ser el tratamiento con concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> durante cortos periodos de tiempo en el proceso de almacenamiento post-cosecha. Considerando el bajo riesgo de este tratamiento, el empleo de pretratamientos con concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> para controlar el daño producido por la Botrytis manteniendo la calidad de la uva de mesa puede ser un área de investigación interesante, para ello hay que conocer la eficacia de un pretratamiento con elevados niveles de CO<sub>2</sub> en el control de la calidad. En este sentido, se ha estudiado<sup>174</sup> la correlación existente entre los mecanismos de defensa activados en las uvas y la aplicación de una atmósfera controlada.

Este carácter antifúngico no específico del que se ha venido hablando y la acumulación selectiva de trans-resveratrol en la piel de la uva convierte a este compuesto en candidato idóneo como pesticida natural en la uva<sup>175</sup> y otras frutas<sup>175-177</sup>. Se mencionó la importancia del desarrollo de pesticidas naturales como una de las estrategias para frenar las pérdidas en los cultivos. Cada vez más un mayor número de especies patógenas desarrollan inmunidad a los pesticidas sintéticos. Si unimos este hecho a la toxicidad de dichos pesticidas y a los largos tiempos necesarios para su degradación, el desarrollo de pesticidas naturales se perfila como una solución alternativa a todos estos problemas.

De acuerdo con lo que se ha ido señalando al principio de la introducción de esta tesis el acoplamiento de dos o más técnicas viene a aprovechar las ventajas particulares de cada una de ellas como consecuencia del proceso sinérgico que se establece entre las mismas. Este aspecto ha motivado el diseño y puesta a punto de un sistema de acoplamiento entre las técnicas GC y REMPI-TOFMS como se presentará en la segunda parte dedicada a resultados experimentales. De la combinación de ambas técnicas surge la GC-REMPI-TOFMS en donde la etapa de desorción de la LD-REMPI-TOFMS queda eliminada a la vez que se introduce un detector selectivo al propio proceso de separación cromatográfica. Este detector como se ha venido comentando a lo largo de la introducción, representa un salto exponencial en cuanto a selectividad y sensibilidad con respecto a los ya existentes para GC lo que ha supuesto la sustitución del detector propio del cromatógrafo de gases por uno de mayor amplitud y selectividad como es el REMPI-TOFMS.

La detección y análisis llevada a cabo para una molécula concreta por medio de la técnica REMPI-TOFMS supone el conocimiento del espectro REMPI de dicha molécula para de esa forma proceder a la ionización selectiva según se ha comentado. Este aspecto implica que otra ventaja derivada de la separación cromatográfica sea la posibilidad de realizar múltiples análisis de compuestos presentes en una muestra sin más que ir variando la longitud láser de ionización, aprovechando los tiempos muertos propios de cualquier separación cromatográfica y el empleo de láseres OPO (de oscilación paramétrica) que proporcionan un rápido cambio en la longitud de onda.

Una vez comprobado el correcto funcionamiento del sistema GC-REMPI-TOFMS por la inyección en el puerto del GC de una mezcla de patrones puros y su posterior ionización y detección por medio de la técnica REMPI-TOFMS, se ha procedido a su validación y para ello al ser una de las partes del acoplamiento un GC y tener como pretensión principal el análisis directo, de acuerdo con la filosofía de trabajo que se ha venido teniendo hasta el momento, se ha elegido una molécula de un gran interés biológico, el trans-estilbeno, como molécula para validar la nueva técnica.

El trans-estilbeno al igual que muchos otros compuestos presentes en frutas, verduras y vino con capacidad antioxidante como son ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, derivados de tirosina, flavonoides y taninos, es un compuesto de interés biológico que por sus características físico-químicas, su análisis por GC resulta sencillo y directo. La molécula de trans-estilbeno, al igual que la molécula de trans-resveratrol, presenta dos formas isoméricas cis y trans.

Dado que el trans-estilbeno es un compuesto presente en distintas frutas, teniendo en cuenta sus propiedades físico-químicas es ideal para validar esta técnica pues se puede analizar de forma directa sin tener que invertir tiempo en el proceso de preparación y acondicionamiento de la muestra antes de ser analizada, eliminando con ello arduos protocolos de preparación que son la principal fuente de error según se ha venido comentando. Así pues, de la inyección directa por el puerto de inyección del GC se puede obtener la correspondiente señal del compuesto en el osciloscopio. Se concluirá con el análisis del contenido en trans-estilbeno en una muestra natural de piel de uva.

En resumen podemos anticipar que algunas de las lagunas existentes han sido ampliamente superadas con los desarrollos y objetivos logrados en esta tesis como detalladamente se describe en sus distintos apartados y posteriormente se resumen, destacando las principales conclusiones en el apartado final.

## **2. SISTEMA EXPERIMENTAL.**

## 2.1.DESORCIÓN LÁSER-IONIZACIÓN MULTIFOTÓNICA RESONANTE -TIEMPO DE VUELO.

El sistema empleado está compuesto por dos cámaras de alto vacío, dos láseres pulsados de alta energía sincronizados y equipos electrónicos como se muestra en la Figura 2.1.

Las dos cámaras de alto vacío son de acero AISI 304 y fueron construidas en el taller mecánico del Instituto Pluridisciplinar. En la primera cámara, tiene lugar la desorción de la muestra, la ionización de las moléculas desorbidas y la aceleración de los iones hacia la segunda cámara, que es el tubo de tiempo de vuelo donde se realiza la detección de los iones. Las cámaras están unidas mediante una válvula de guillotina (Varian 6'') y poseen sistemas independientes de vacío compuesto cada uno de ellos por una bomba turbomolecular conectada a una rotatoria (Varian V250 + Trivac D6B) y (Varian V70 + Trivac D4B) respectivamente.

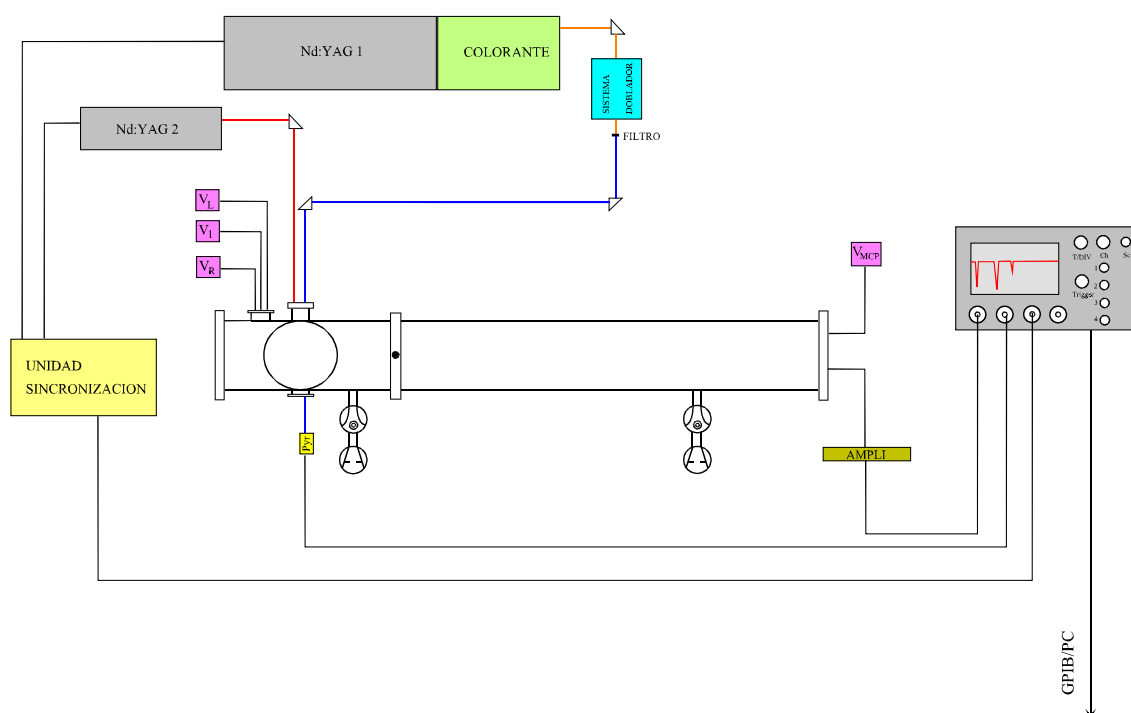


Figura 2.1. Disposición general de los elementos en la técnica LD-REMPI-TOFMS.



Durante los experimentos la presión se mantuvo siempre por debajo de  $3 \times 10^{-6}$  mbar en el interior de la cámara de ionización, y de  $1 \times 10^{-6}$  mbar en la cámara de tiempo de vuelo con el fin de obtener unos espectros con una relación señal/ruido aceptable sin perjudicar los detectores microcanales al final del tiempo de vuelo. La presión es registrada mediante dos medidores (Balzers IKR 250), independientes para cada cámara, conectados a un lector digital (Balzers TPG 252) que a su vez proporciona la lectura de los valores previos de presión dados por dos medidores de tipo Pirani (Balzers TPR 250).

Intercaladas entre las bombas rotatorias y las cámaras de desorción e ionización hay sendas trampas de nitrógeno líquido cuya finalidad es lograr una mejora en el vacío conseguido en las cámaras, evitando por una parte que los vapores procedentes de la desorción retornen a la cámara y por otra evitando el paso del fluido operante de las rotatorias a las cámaras, si bien este último aspecto se ve ayudado por las válvulas antirretorno que llevan incorporadas las bombas rotatorias.

La muestra a desorber, se deposita sobre un disco de pyrex ( $\phi = 50$  mm) que se sitúa al principio de las placas aceleradoras. Un motor paso a paso (Crouzet) hace girar el disco durante el análisis posibilitando así la variación del área de desorción. El disco va sujeto a un vástago con posibilidad de movimiento ascendente-descendente junto con la posibilidad de giro (Pfeiffer 243010-t) lo cual permite optimizar el proceso de desorción.

Para desorber la muestra se emplea un láser de Nd:YAG (Continuum Surelite) en su 1<sup>er</sup> armónico (1064 nm) con un pulso de 5 ns de duración que incide frontalmente sobre la muestra y trabajando en un rango de energías que oscila entre 20 y 50 mJ por pulso. El haz de moléculas desorbidas se expande dentro de la zona de aceleración donde son ionizadas por el 4<sup>o</sup> armónico de un segundo láser de Nd:YAG (Continuum ND81), Brilliant B o por un láser de colorante (Continuum ND 60) acoplado al láser de Nd:YAG (Continuum ND81) y doblado en frecuencia mediante un sistema doblador (Inrad-AT-III-UV) en cuya salida hay que poner un filtro (Melles Griot UG11) con el fin de absorber la radiación visible que no se ha doblado. Con el fin de disponer en todo momento de condiciones óptimas de estabilidad de los pulsos láser, tanto en el láser empleado para la ionización así como en el láser empleado para la desorción, la disminución de la energía con respecto al óptimo se llevó a cabo variando las condiciones de retraso entre los disparos de la lámpara de destello y el conmutador del factor

$Q^{178,179}$ . El sistema doblador Inrad permite trabajar en un amplio intervalo de longitudes de onda de entrada gracias a los cristales y filtros accesorios que lleva incorporado, de modo que dependiendo de la combinación de cristal doblador y filtro se podrán obtener longitudes de onda de salida desde 221 nm hasta 442 nm, valores que cubren un amplio margen en longitudes de onda para poder localizar la ionización resonante de una molécula. El sistema Inrad presenta además una ventaja adicional de poder buscar de forma automatizada el haz doblado óptimo mientras se realiza un barrido en frecuencia con el láser de colorante. El láser de ionización intercepta perpendicularmente el haz de moléculas desorbidas, figura 2.2, pudiendo variarse la distancia entre las zonas de desorción e ionización entre 5 y 30 mm mediante un tornillo micrométrico.

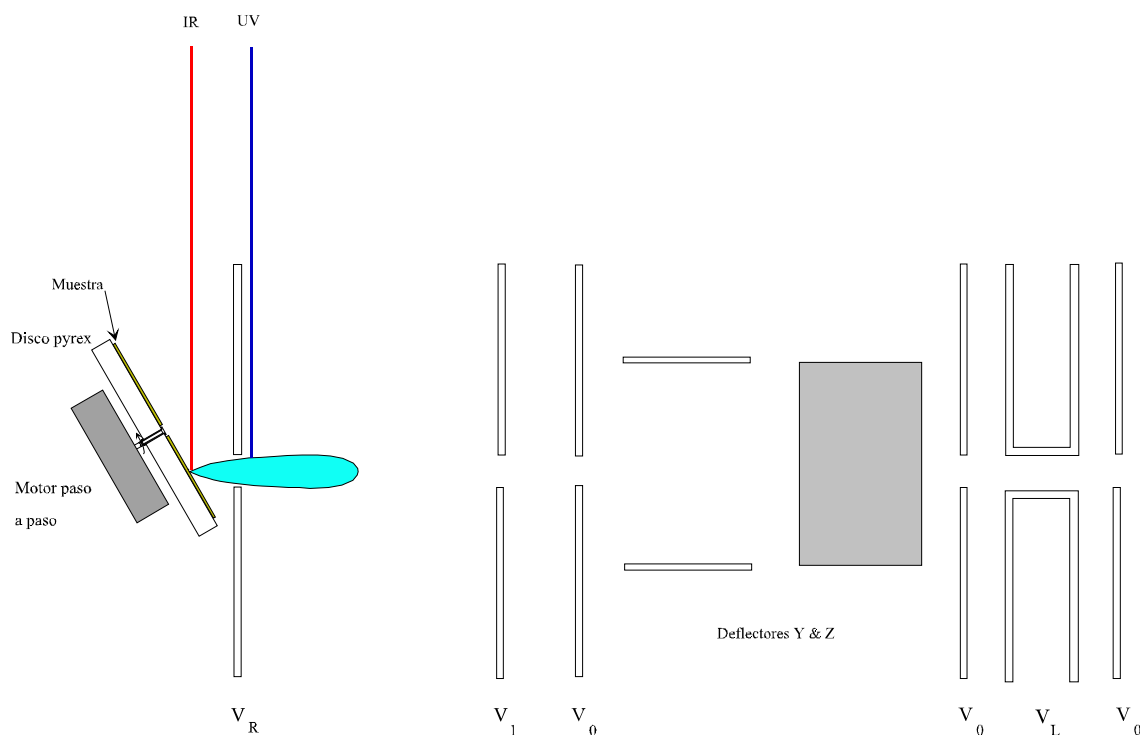


Figura 2.2. Vista frontal de los procesos de desorción e ionización.

Tanto el láser de desorción como el de ionización trabajan a una frecuencia de 10 Hz y el retraso entre ambos láseres se controla mediante un generador de pulsos diseñado y construido en la ULHM. En la medida de la energía de la radiación de ionización se emplea un detector piroeléctrico (Gentec De-100) para energías comprendidas en el intervalo de 0 a 10 mJ/pulso o con un detector calorimétrico (Coherent Fieldmaster) para energías mayores al anterior intervalo. Además se dispone de una serie de filtros que se interponen entre la

radiación láser y el detector propiamente dicho en función de cual vaya a ser la longitud de onda empleada en la desorción, con el fin de salvaguardar el detector ante incidencias de radiación directas. Este último detector se emplea siempre en la medida de la energía de desorción. El sistema cuenta además, a lo largo de todo el recorrido óptico, con diafragmas regulables para controlar las áreas de desorción e ionización.

Los iones producidos por el segundo pulso láser son acelerados hacia la cámara de tiempo de vuelo. El sistema acelerador de los iones es del tipo Wiley-McLaren. Como puede apreciarse en la figura 2.3 está compuesto por un conjunto de placas circulares con un orificio en su centro y conectadas cada una de ellas a una fuente de alto voltaje (Stanford Research System Inc., PS300); la aceleración se realiza en dos etapas:  $V_1 \rightarrow V_2$  y  $V_2 \rightarrow V_3 = 0$ . El sistema también incluye dos deflectores en las direcciones Y y Z, perpendiculares a la trayectoria del TOF y una lente iónica Einzel que colima los iones en la dirección del detector. Una vez atravesada  $V_3 = 0$  los iones entran en la cámara de vuelo libre en ausencia de campo eléctrico, separándose así en función de su masa. Los iones son detectados mediante un detector de platos microcanales (Comstock CP-625C/50F) situado al final de la cámara y acoplados a un amplificador de señal Stanford Research System (SR445, DC 300 MHz) para amplificar la señal. Finalmente, la señal es registrada por un osciloscopio digital Lecroy LC334AM que posibilita trabajar con 2 Gs/s a 500 MHz, permitiendo obtener gran resolución horizontal y vertical (20  $\mu$ V) en los espectros, y promediando dicha señal, según resulte su duración, sobre 200-400 disparos del láser.

El espectro de TOF es entonces transferido a un PC a través de una interfase GPIB (Nationals Instruments). La adquisición de datos en el PC se lleva a cabo mediante un programa diseñado en nuestro grupo investigador<sup>a</sup>. Este programa, comunica por un lado al PC con el osciloscopio mediante la interfase tipo GPIB y por otro, al láser de colorante a través del puerto de serie (RS-232). Se consigue así realizar barridos en frecuencia de forma automatizada siempre y cuando el doblador INRAD esté en modo de seguimiento automático. Por lo tanto, gracias al desarrollo de este sistema, es posible obtener espectros REMPI de un analito de forma automatizada. Además el programa permite recoger al mismo tiempo el espectro de tiempo de vuelo y la energía del láser de ionización, lo que permitirá hacer las

---

<sup>a</sup> Se agradece al Dr. Stefan Skowronek la elaboración de un programa de adquisición de datos para tal efecto.

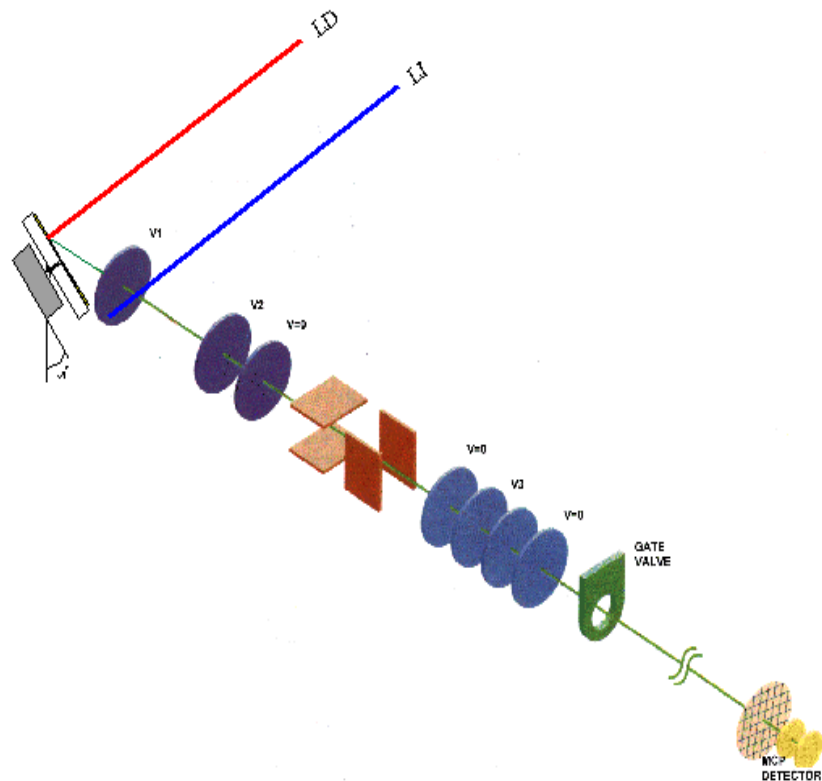


Figura 2.3. Disposición general del sistema de placas aceleradoras y detección.

A continuación, se va a exponer de una manera sucinta el fundamento de la técnica de tiempo de vuelo. Para ello, sea un sistema de placas aceleradoras dispuestas tal como se muestra en la figura 2.4 y con una geometría adecuada. Hay un conjunto de potenciales tales que se cumple:

$$\frac{\partial t}{\partial V} = 0 \quad \frac{\partial t^2}{\partial^2 V} = 0 \quad [2.1]$$

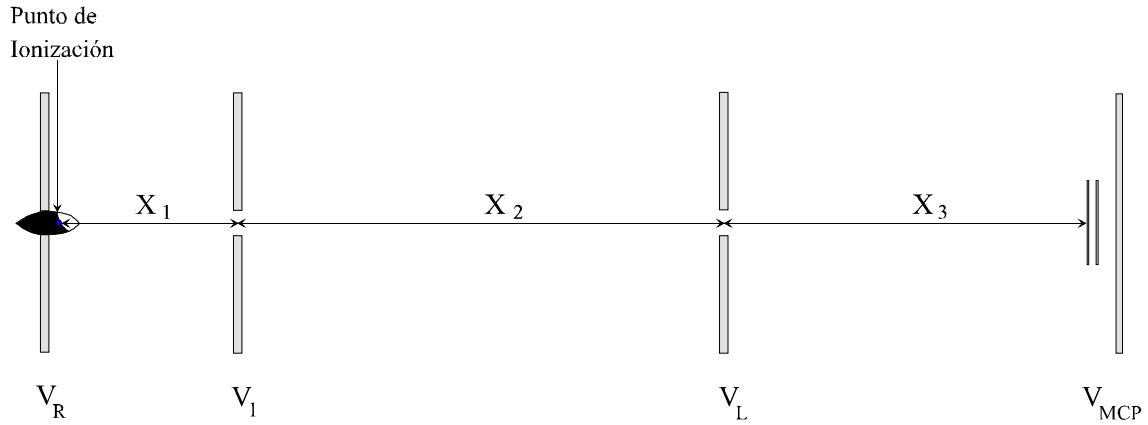


Figura 2.4. *Detalle de las distancias recorridas por la molécula desde que es ionizada.*

A diferencia de lo que ocurre con la anulación de la primera derivada, la anulación en la segunda derivada implica una posición fija para el punto de ionización. Dicho valor,  $x_{SF}$ , está determinado por una relación entre  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ :

$$x_1 = \frac{x_{SF} - 2x_2}{2(x_{SF} + x_2)} \left( x_{SF} \left( \frac{x_{SF} - 2x_2}{3x_2} \right)^{3/2} + x_2 \right) \quad [2.2]$$

La relación entre la energía cinética final del ión  $V$  y el potencial en el segundo electrodo es:

$$V_2 = V(2x_{SF} + 2x_2)/3x_{SF} \quad [2.3]$$

Para la disposición geométrica tal como se muestra en la figura 2.4, el tiempo de vuelo del ión desde el punto en que resulta ionizado se obtendrá como suma de los tiempos:

$$t = t_1 + t_2 + t_3 \quad [2.4]$$

Siendo:

$$t_1 = 2 \cdot x_1 \cdot C \cdot \sqrt{\frac{M}{V - V_2}} \quad [2.5]$$

$$t_2 = 2 \cdot \frac{x_2}{V_2} \cdot C \cdot \sqrt{M} \cdot (\sqrt{V} - \sqrt{V - V_2}) \quad [2.6]$$

$$t_3 = x_3 \cdot C \cdot \sqrt{\frac{M}{V}} \quad [2.7]$$

donde  $C = 0,71986 \mu\text{s V}^{1/2} \text{ cm}^{-1}$  es una constante,  $V$  es la energía del ión en voltios,  $V_2$  es el voltaje en voltios de la segunda placa aceleradora,  $M$  es la masa del ión en uma, y las variables  $x_1$ ,  $x_2$ , y  $x_3$  en cm son las distancias que recorre el ión en cada una de zonas según se muestra en la figura 2.4.

Estas fórmulas utilizadas para calcular el punto focal de los iones se conocen como fórmulas de Wiley-McLaren<sup>15</sup>, según las cuales se consigue una mayor resolución para un foco de segundo orden, es decir cuando la segunda derivada del tiempo con respecto a la energía es cero.

La obtención de una primera aproximación a los voltajes de las placas aceleradoras se realizó empleando una simulación con el programa SIMION en su versión 7.0 diseñado por el “Idaho National Engineering Laboratory”. El programa SIMION permite calcular la intensidad de campo eléctrico en cada punto de un sistema de electrodos de distinto tamaño y voltaje, así como las trayectorias de los iones formados en distintos puntos espaciales para diferentes energías cinéticas de los iones y ángulos de salida iniciales.

Los parámetros a tener en cuenta en la simulación son la posición de partida del ión en el eje x del tiempo de vuelo, el tamaño de los agujeros de paso en las placas aceleradoras, la distribución inicial de energía cinética de los iones, los voltajes empleados así como el tamaño del área de ionización.

En la siguiente tabla se detallan los voltajes empleados en este método:

<b>Etapas</b>	<b>V</b>
Reflector ( $V_1$ )	3000
Extractor ( $V_2$ )	-2100
Lente ( $V_3$ )	500
Placas Microcanales ( $V_{MCP}$ )	-2000

Tabla 2.1. *Parámetros de voltaje teóricos obtenidos por el programa SIMION v. 7.0*

De los anteriores voltajes, el voltaje a que están sometidas las placas microcanales es el aconsejado por el fabricante,  $V_{MCP} = -2000$  V. En la obtención de los voltajes de nuestro modelo real se deben considerar las inhomogeneidades de los campos eléctricos aceleradores debido a efectos como el tamaño finito de las placas aceleradoras (efectos de borde), distorsiones debidas a los orificios centrales de las placas, etc., por lo que una vez obtenidos los voltajes mediante la simulación se procede a su optimización experimental hasta obtener la mayor intensidad de señal posible.

Como ya se ha mencionado el sistema está diseñado para desorber muestras sólidas y posteriormente producir la ionización selectiva del analito en estado de vapor. Para las ocasiones en las que la muestra esté en estado gaseoso, existe una entrada de gases mediante una válvula de aguja (Whitey 316) en la parte superior de la cámara de ionización, posibilitando así la ionización directa del gas introducido sin necesidad de desorber. En el caso en que la muestra se encuentre en estado líquido, hay que hacer uso de su presión de vapor para ser introducida en la cámara de desorción por lo que hay que degasificar previamente la muestra y para ello hay que congelar la muestra haciendo uso de nitrógeno líquido, de modo que con la muestra congelada el gas remanente se va evacuando abriendo ligeramente la válvula de aguja y por consiguiente, en el proceso de ionización se obtendrán espectros más limpios y máxime cuando se ionice con longitudes de onda no resonantes.

Otra ventaja añadida a la ionización selectiva es el corto tiempo de análisis requerido por el sistema. Así, un espectro de tiempo de vuelo es promediado durante 40 segundos; si consideramos que la frecuencia de repetición de nuestro láser es de 10 Hz, eso hace que obtengamos un promedio sobre 400 vaporizaciones de nuestra muestra, es decir, el proceso de desorción y la posterior ionización del analito se repite 400 veces en un periodo de 40

segundos. Este tiempo, se puede reducir siempre y cuando la pérdida de precisión no resulte en una disminución excesiva de la relación señal/ruido. A este tiempo de análisis propiamente dicho, hay que sumarle el tiempo para alcanzar el vacío necesario para comenzar a medir sin problemas sin un ruido excesivo de fondo, tiempo que viene a oscilar entre 15-25 minutos, según el tiempo que haya estado expuesta la cámara a la presión atmosférica. Las cámaras de alto vacío están separadas por una válvula de guillotina que posibilita no perder el vacío en la cámara de tiempo de vuelo mientras se abre o cierra la cámara de ionización para introducir o sacar la muestra, haciendo posible la recuperación del vacío en un tiempo menor que si no existiera dicha válvula de guillotina. Las muestras a analizar se deben depositar sobre el disco de pyrex haciendo uso de un aerógrafo (Rotring-255004), proceso que puede llevar como máximo dos minutos.

Dependiendo del estado inicial de la muestra y de la técnica de análisis empleada son muchos los procesos que pueden ser necesarios en la fase de pretratamiento, acondicionamiento de las muestras seleccionadas de tal manera que puedan ser sometidas al proceso de análisis, tales como la filtración, dilución, ajuste de pH, evaporación, concentración, centrifugación, derivación, calentamiento, precipitación, digestión, homogeneización, enfriamiento, liofilización, diálisis, extracción en fase líquida, etc.

No debe olvidarse que, además de ser los responsables del mayor consumo de tiempo, estos procesos de preparación de muestra constituyen una de las mayores fuentes de error del proceso de análisis. La utilización del láser en el proceso de desorción, junto con la selectividad y sensibilidad de la técnica REMPI + TOFMS permite simplificar de manera importante la preparación de la muestra eliminando por lo tanto, importantes fuentes de error.

### ***2.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.***

La deposición de la muestra sobre la placa de pyrex se realiza por medio de un aerógrafo con cazoleta (Rotring-255004) con una boquilla de 0,4 mm de diámetro en cuyo interior se deposita la muestra, todo ello montado sobre un regulador micrométrico con el fin de poder optimizar el proceso de deposición de muestra, de modo que una corriente de nitrógeno seco a aproximadamente 2 bares arrastra todo el contenido de la cazoleta hacia la placa pyrex tal y como se aprecia en la figura 2.5. En el proceso de eyección se produce una súbita disminución



de la presión con lo que gran parte del disolvente se evapora resultando una deposición semiseca lo cual ayuda a tener una placa lo más homogénea posible. Por lo tanto disponer de disolventes con elevada presión de vapor mejora la homogeneidad de la deposición. El disco pyrex se encuentra en todo momento girando a velocidad angular constante gracias a un motor (Co Ltd Micro G2), frente a la placa y a una distancia regulable se sitúa el aerógrafo que trabaja de modo continuo impulsando la muestra mediante un gas inerte ( $N_2$ ) a una presión aproximada de 2 bares.

La muestra que se va a depositar haciendo uso de esta técnica, en el caso de tratarse de muestras naturales, como hoja de vid, Bistorta del Japón..., van a proceder de una maceración en etanol que ha tenido lugar durante un determinado periodo de tiempo, previa micropulverización con un molino (Ika A11) que proporciona un tamaño de partícula de  $1\ \mu m$  con lo que se aumenta la sección eficaz en el proceso de maceración. Transcurrido el periodo de maceración, se toma una pequeña cantidad del total, cantidad que oscilará entre 0,5-1 mL, para proceder a su deposición sobre la placa de pyrex.

Hay ocasiones en las cuales la muestra esté en condiciones óptimas de ser depositada directamente sobre la placa y pasar a su posterior análisis, tal es el caso de muestras líquidas como los extractos etanólicos de hoja de vid, piel de uva, etc.

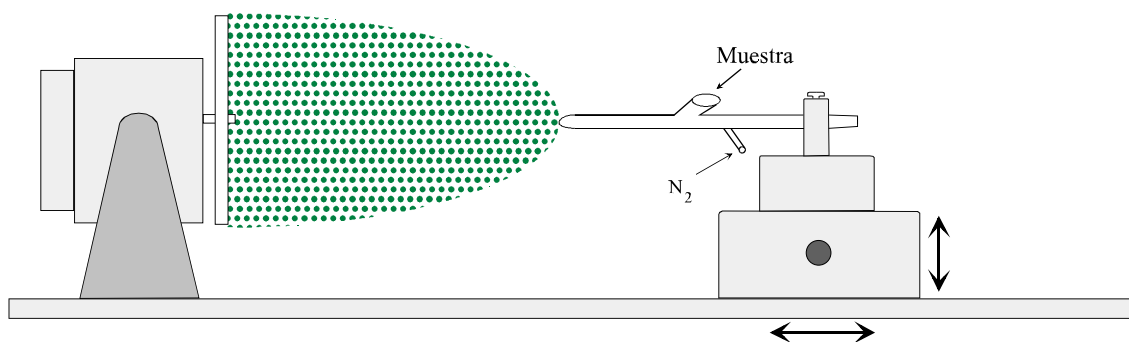


Figura 2.5. Sistema dispersor de la muestra sobre el disco de pyrex.

En determinados casos en que la muestra presente una mayor consistencia como la piel de uva, interesa exprimir la muestra directamente y para ello se hace uso de una prensa Rogen de  $800\text{ Kg/cm}^2$ . Dicha prensa, es la encargada de presionar la muestra introducida en un contenedor cilíndrico con un orificio de salida diseñado para tal efecto.

### 2.1.2. CONDICIONES DE MEDIDA.

De todos los parámetros experimentales que van a intervenir en cada experimento, los hay que se mantendrán dentro de unos márgenes establecidos como son los valores relativos a la presión en las cámaras, la frecuencia de repetición de los láseres etc, y otros que por el contrario variarán según sea la molécula interés de estudio tales como la longitud de onda en la que se produce el REMPI, retraso del láser de ionización con respecto al láser de desorción.

La presión de medida en ambas cámaras oscila entre  $3 \times 10^{-6}$  y  $7 \times 10^{-7}$  mbar, evitando que el detector de placas microcanales opere a presiones superiores de  $3 \times 10^{-6}$  mbar.

En la tabla 2.2 se presentan los voltajes experimentales a los que están sometidas las placas aceleradoras:

ETAPA	V
Reflector ( $V_1$ )	3500
Extractor ( $V_2$ )	-2500
Lente ( $V_3$ )	500
Placas Microcanales ( $V_{MCP}$ )	-2000

Tabla 2.2. *Voltajes experimentales empleados en el sistema de placas aceleradoras y de detección.*

La distancia entre los puntos de ionización y desorción es de aproximadamente 7 mm, es por ello que hay que disponer de retrasos adecuados entre los láseres de desorción y ionización con el fin de optimizar la señal. Dicho retraso, está optimizado experimentalmente en 27  $\mu$ s.

La duración de un pulso láser oscila entre los 4 y los 6 ns, y la frecuencia de repetición para ambos láseres es de 10 Hz. En general, las medidas se realizan promediando entre 60 a 400 espectros con el osciloscopio Lecroy LC334AM (500 Mhz 2 GS/s).

La energía de desorción es un parámetro experimental cuyo valor se fija al obtener la máxima intensidad de señal con la mínima fragmentación de la masa estudiada. En el caso del trans-resveratrol, la energía del láser de desorción oscilará entre 20-50 mJ/pulso en función de cómo se compacta esta muestra sobre la superficie de pyrex. La longitud de onda resonante para el caso del trans-resveratrol es  $\lambda=302,1$  nm y la energía de ionización empleada varía entre 350 y 550  $\mu\text{J}$  / pulso.

Una vez terminado el proceso de medida, la placa presenta un surco característico de haber incidido sobre ella el láser de desorción. La figura 2.6 muestra dicho surco para el caso concreto del análisis de una muestra de Bistorta de Japón.



Figura 2.6. *Surco producido por el láser de desorción al incidir sobre la muestra.*

## 2.2. GC-REMPI-TOFMS.

La disposición GC-REMPI-TOFMS difiere de la anterior en la incorporación de un sistema cromatográfico entre el punto de inyección de la muestra y el punto de ionización, lo que supone la eliminación de la desorción según la disposición LD-REMPI-TOFMS anterior. Esta nueva configuración, se puede ver en la figura 2.7.



Figura 2.7. Vista general del sistema experimental GC-REMPI-TOFMS.

El conjunto de la técnica GC-REMPI-TOFMS presenta la ventaja respecto a la técnica REMPI-TOFMS de proporcionar una separación cromatográfica antes de ser ionizados los compuestos y por consiguiente se obtendrá una ionización más eficaz sobre el conjunto de moléculas que componen la matriz dada.

El acoplamiento GC-REMPI-TOFMS presenta la ventaja adicional con respecto al cromatógrafo de forma aislada de disponer de una información en masas junto con una mayor resolución que proporciona la parte REMPI-TOFMS para compuestos de elevado peso molecular.

Con esta técnica, además de tener separación cromatográfica, se tendrá ionización selectiva, pudiéndose seleccionar el compuesto de interés en función de su tiempo de elución. Cuando se procede al análisis de muestras complejas de origen vegetal, existen multitud de componentes de características similares al analito de interés que pueden aparecer en el espectro de masas por lo que su previa separación cromatográfica hace que esta técnica resulte más atractiva que la LD + REMPI-TOFMS. Además, la separación física entre ambas técnicas hace que se puedan optimizar por separado con lo que, por un lado, la posibilidad de disponer de una amplia variedad de columnas y accesorios para cromatografía en el mercado hace que los tiempos de retención característicos de los analitos de interés se puedan variar y con ello poder acelerar el proceso de análisis.

La cromatografía de gases es un método de separación en el cual los componentes de una mezcla se reparten entre dos fases, la fase estacionaria (sólida) y la fase móvil, que es un gas inerte que circula en contacto con la fase estacionaria. La muestra se vaporiza en el sistema de inyección y es transportada por la fase móvil gaseosa a través de la columna. Los componentes de la mezcla se separan entre sí en función de sus presiones de vapor relativas y de acuerdo con sus afinidades con la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se denomina elución. Así, por ejemplo, los analitos que interaccionan fuertemente con la fase estacionaria eluirán de la columna más tarde que los que interaccionen débilmente. El tiempo al que el analito es detectado a la salida de la columna se llama tiempo de retención, que es característico de cada sustancia. El resultado final es la visualización de una serie de picos de distinta intensidad situados a un tiempo determinado, llamado cromatograma.

El cromatógrafo de que disponemos, es un cromatógrafo de gases comercial Varian CP-3800 GC que incorpora una columna Quadrex metil 50% fenil silicona de 30 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y máxima temperatura de trabajo de 350°C, se trata de una columna de polaridad media de modo que dará una visión más general de todos los compuestos presentes en una matriz. Dispone de un inyector 1079 que permite trabajar en modo *split*<sup>a</sup>. A su vez, dispone de un detector universal FID, este tipo de detector da una respuesta proporcional al número de iones CHO<sup>+</sup> que se pueden formar a partir de enlaces C-H procedentes de las moléculas eluyentes en combinación con el oxígeno combustible. Permite trabajar con programas de temperatura pero no presenta control electrónico neumático; este hecho, presenta el inconveniente de no poderse controlar la presión del gas portador en la columna durante un análisis dado que, durante el mismo, al variar la temperatura de la columna también lo hará la presión del gas que circula por ella, aspecto que provocará un empeoramiento de la señal, por ensanchamiento del pico, cuanto mayor sea la temperatura programada en el programa de temperatura seleccionado.

Los gases combustibles son aire e hidrógeno. Los caudales, Q, de los gases que se han empleado en el cromatógrafo son:

Gas	Q (mL/min)
Portador N <sub>2</sub>	30
Columna N <sub>2</sub>	1-2
Combustible H <sub>2</sub>	30
Combustible O <sub>2</sub>	300

Tabla 2.3. Caudales de los diferentes gases del sistema cromatográfico.

Para la unión entre el cromatógrafo y el sistema REMPI-TOFMS se diseñó una interfaz estanca cuyos elementos de unión de acero inoxidable AISI 304 se construyeron en el taller mecánico del IP. Dicha unión es atravesada por un tubo capilar, procedente de la columna del cromatógrafo, debidamente termostatzado.

<sup>a</sup> Por relación de split se entiende a la fracción de sustancia que entra en la columna cromatográfica en relación a la que es inyectada.

Los requisitos que debe de tener la unión entre el cromatógrafo y el sistema REMPI-TOFMS son:

- 1) Presentar la estanqueidad adecuada para poder trabajar con un margen de vacío adecuado.
- 2) Estar termostatizada en toda su longitud a modo de evitar la condensación en el capilar que va por su interior.
- 3) Presentar un aislamiento térmico adecuado para evitar posibles daños por quemadura.

Conviene señalar que se están acoplando dos sistemas que están a presiones muy diferentes, por lo tanto hay que procurar una disposición acorde a tal situación. Para ello, se aprovecha la circunstancia de que todo fluido circulando a lo largo de un tubo, sufre unas pérdidas de presión por rozamiento.

La medida de la pérdida de presión entre dos puntos de un tubo viene cuantificada por las siguiente expresion<sup>180</sup>:

$$\Delta P = 4f \frac{L}{D_E} \frac{1}{2} \rho v^2 \quad [2.8]$$

Con:

$\Delta P$  : Diferencia de presión entre los dos puntos seleccionados.

f: Factor de fricción de Fany.

L: Longitud de recorrido característica.

$D_E$ : Diámetro de sección del tramo seleccionado.

$\rho$ : Densidad del fluido contenido en la línea.

$v$ : Velocidad del fluido por la línea.

Teniendo la velocidad media,  $v$ , la siguiente expresión:

$$v = \frac{Q}{A} \quad [2.9]$$

siendo:

$Q$  : Caudal de fluido a lo largo del conducto.

$A$ : Área o sección del conducto en cuestión.

y el diámetro equivalente,  $D_E$

$$D_E = \frac{4A}{P} \quad [2.10]$$

En nuestro caso, por estar trabajando con secciones circulares  $D_E = D$ .

En la ecuación 2.8 aparece un factor  $f$  que depende del número de Reynolds,  $R_e$ , la geometría de la sección y, en régimen turbulento, de la rugosidad relativa de la superficie interna del conducto,  $\varepsilon/D_E$ . Para una sección circular de conducto, el coeficiente de fricción se denota como  $f_c$ .

El número de Reynolds está definido como:

$$R_e = \frac{\rho v D_E}{\mu} = \frac{v D_E}{\nu} \quad [2.11]$$

Siendo  $\mu$  y  $\nu$  los coeficientes de viscosidad y viscosidad cinemática respectivamente.

La caída de presión se puede expresar como una disminución en la distancia relativa entre la parte más adelantada y retrasada del fluido tal y como lo muestra la ecuación 2.12.



$$h = \frac{\Delta p}{\rho g} \quad [2.12]$$

con  $g$  la constante gravitacional ( $9,81 \text{ m/s}^2$ ).

Juntando las expresiones 2.8 y 2.12 resulta:

$$h = 4f \frac{L}{D_E} \frac{V^2}{2g} \quad [2.13]$$

Cualquier sección va a presentar irregularidades a lo largo de su superficie, una forma de tener en cuenta estas irregularidades es englobándolas en un coeficiente al que se le denomina rugosidad efectiva  $\varepsilon$ . Dicho coeficiente se puede encontrar tabulado para distintas geometrías.

En caso de ser el flujo laminar para un tubo de sección circular, no hay que tener en consideración el factor  $\varepsilon$  y el factor de fricción para este tipo de flujos viene dado por la siguiente ecuación.

$$f_c = \frac{16}{R_e} \quad [2.14]$$

Esta relación tiene validez cuando el valor del número de Reynolds adquiere valores  $R_e < 2000$  lo que asegura que el fluido se encuentra en régimen laminar.

En la zona crítica de transición de flujo laminar a turbulento, el factor de fricción sólo se puede calcular por estimación empírica.

Para los casos de régimen turbulento, se dispone de ábacos y tablas en los que se incorporan factores de corrección que tienen en cuenta la geometría de la sección y valores de Reynolds excesivamente grandes.

Dados los pequeños valores de los diámetros internos de los capilares y la muy baja velocidad con la que se moverá el fluido a su través, caudales máximos a  $1,5 \text{ mL/min}$ , se

puede asegurar que las moléculas se dispondrán en un régimen laminar pudiéndose emplear para el factor de fricción la expresión 2.14 que introducida en la expresión 2.8 tras operar y simplificar resulta:

$$\Delta P = \frac{128 \nu L \rho Q}{D^4} \quad [2.15]$$

Como primera aproximación, tomando valores característicos para el nitrógeno en condiciones normales de densidad y viscosidad, con una longitud de capilar entre el final de la columna cromatográfica y el punto de ionización de aproximadamente 10 m, teniendo en cuenta que a la salida de la columna capilar el movimiento del fluido se traduce en que sale a valor inferior a la presión atmosférica, de la expresión 2.16 se puede despejar el valor del diámetro de tubo capilar para nuestras condiciones de trabajo resultando un valor de  $D = 0,21$  mm.

El valor de D calculado no deja de ser un valor aproximado que sirve de referencia para empezar con el montaje. Es cierto que una de las aproximaciones más severas realizadas ha sido el tomar un valor fijo para la viscosidad, ya que esta depende de la temperatura y según el programa de temperatura de que se disponga en el cromatógrafo tendremos unos valores distintos, con lo cual la caída de presión variará. Por otra parte, se ha aproximado todo a la densidad del nitrógeno dado que el gas portador es nitrógeno al cual se le sumará la densidad de un gas con multitud de componentes que estarán en muy baja proporción con respecto al nitrógeno dado que las cantidades inyectadas son muy pequeñas y se trabaja con una relación de split de 1/10, aún así la densidad resultará superior a la del nitrógeno. En cualquier caso, será este valor D la referencia inicial puesto que hay que optar por un capilar dentro de la amplia gama de capilares disponibles en el mercado.

El capilar que va dirigido hacia la cámara de ionización debe estar correctamente acondicionado en lo que a temperatura se refiere pues uno de los mayores inconvenientes es la posibilidad de condensación a lo largo de dicha línea de transferencia con la consiguiente disminución en la relación S/N y posible ausencia de la misma.

Cuando un gas se expande al vacío a través de un orificio de diámetro D a partir de una región de alta presión, el carácter del flujo que se produce depende de la naturaleza, la

temperatura y la presión del gas en la zona de alta presión y del diámetro del orificio<sup>181-183</sup>. Cuando el recorrido libre medio  $\lambda_l$  de las partículas de gas es mayor que  $D$ , las partículas atraviesan el orificio sin sufrir colisiones entre ellas, y la distribución de velocidades será la misma que en la zona de alta presión. Cuando  $\lambda_l$  es menor que el diámetro del orificio, las partículas sufren colisiones, lo cual da lugar a un enfriamiento de los grados internos de libertad de las moléculas y un estrechamiento de la distribución de velocidades.

El carácter del flujo es función del número de colisiones que sufren las partículas al atravesar el orificio y es expresado por el número de Knudsen <sup>184</sup>:

$$K_n = \frac{\lambda_l}{D} \quad [2.16]$$

Se habla de un flujo efusivo o molecular para  $K_n$  superior a 3, y de un flujo hidrodinámico para  $K_n$  inferior a 0,1.

En nuestro caso, la expansión de flujo de gas a través del orificio del capilar es de tipo efusivo. Si bien con este tipo de flujo la anchura espectral de velocidades resulta mayor que en uno de tipo hidrodinámico se logran obtener unos espectros muy resueltos.

La figura 2.6 muestra la disposición de los elementos constitutivos de la pieza de unión entre ambas técnicas.

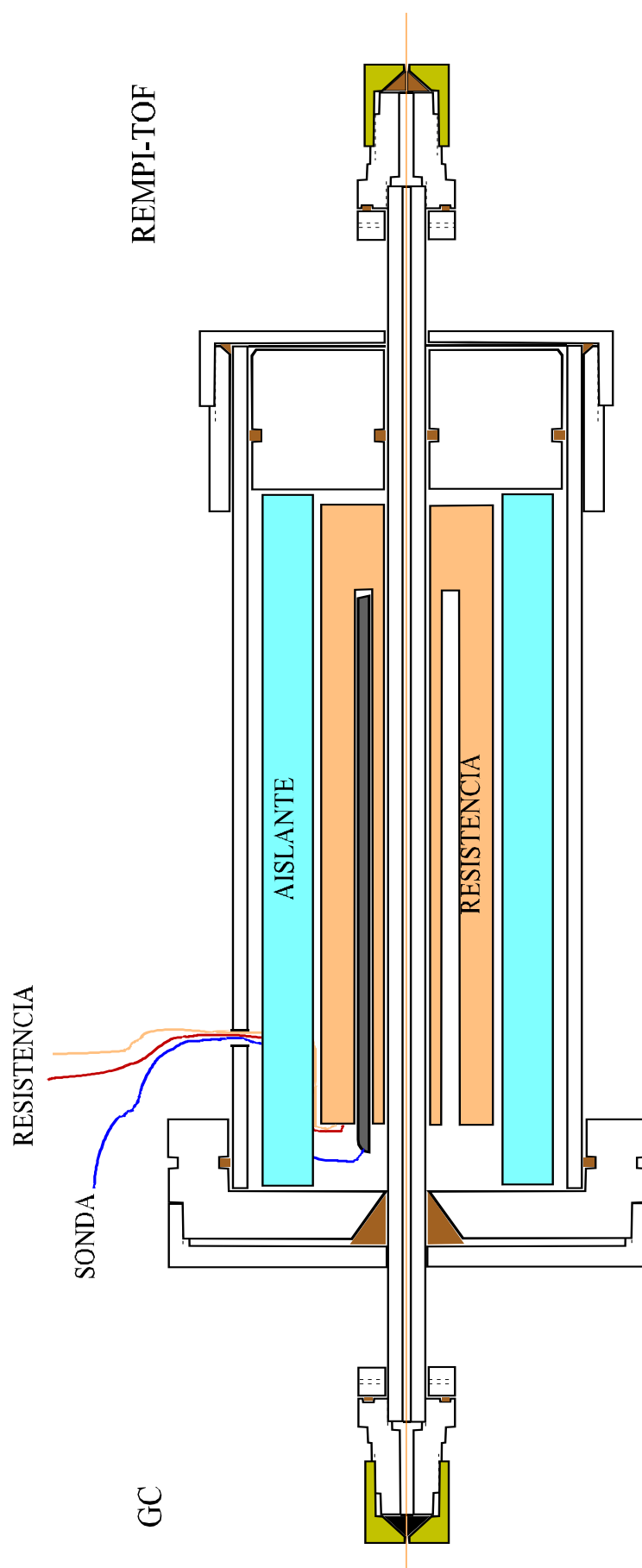


Figura 2.8. Disposición de los elementos constitutivos de la interfaz entre las técnicas GC y REMPI-TOFMS.

La pieza anterior consta de dos tubos concéntricos, siendo sus dimensiones:

<b>Tubo</b>	<b>L (mm)</b>	<b>De (mm)</b>	<b>Di (mm)</b>
Tubo interior	410	410	38
Tubo exterior	345	345	7

Tabla 2.4. *Dimensiones de los tubos constitutivos de la interfaz de unión entre las técnicas.*

Ambos tubos son comerciales suministrados por Symta (Jar 6×1, Jar 8×35). Rodeando al tubo interior se encuentra una resistencia cerámica de 32 cm de longitud la cual se encuentra aislada del tubo exterior por medio de una banda de amianto y una manta de fibra cerámica; dicha resistencia lleva incorporada una sonda termopar (Htx 031 J 00) con un intervalo de actuación de hasta 300°C y controlado por medio de un regulador de temperatura (Termoregolatori Campini). Las piezas necesarias para proceder a la correcta conexión entre la brida de entrada a la cámara de ionización y la entrada al cromatógrafo de gases se realizaron en el taller mecánico del IP. El capilar va a lo largo de la sección del tubo interior y para que esta parte quede correctamente aislada, se hace uso de dos conexiones una a la entrada y otra a la salida. La conexión de salida del cromatógrafo de gases y de entrada a la cámara de ionización se lleva a cabo con un adaptador (Tuerca de conexión de Capilar 394955100) con asiento para una férula (0,4 mm Férula Capilar de Vespel 2869458601) de modo que un acoplador, previamente diseñado, será el encargado de presionar la férula sobre el adaptador ocasionando la estrangulación del capilar y un consiguiente aislamiento de esa parte. En el caso de la salida hacia la ionización, con el fin de evitar contaminaciones por parte de la férula se emplea una férula de diferente composición a la anterior, sin grafito en su composición, (0,4 mm Férula Capilar de Poliamida 2869458601).

Es menester señalar que la pretensión inicial era la de poder simultanear la señal obtenida por medio de la técnica GC-REMPI-TOFMS con la señal directa del cromatógrafo con el fin de tener mejor controlado el proceso, no obstante esta opción se vió imposibilitada por no disponerse en el mercado de válvulas selectoras que operasen en las condiciones de vacío selectivo y márgenes de temperatura tan elevados. Se optó por intercalar una conexión en Y (Conector Rápido Universal CP4797), consistente en una pieza de borosilicato con tres entradas de modo que un sucesivo estrechamiento permite la estrangulación de un capilar en

su interior. Para ello, el capilar que va al vacío debe presentar una mayor restricción que el capilar que va directamente al detector, como primera aproximación se estableció un valor a partir de las expresiones presentadas anteriormente. El capilar restrictor es capilar de 0,1 mm de diámetro interno y tubo de sílice desactivado (CP 99933C).

Con esta disposición, se obtuvieron unos picos poco resueltos cromatográficamente y señales en el REMPI-TOFMS con una relación S/N muy baja. Estas circunstancias hicieron que se descartara esta primera disposición. Se optó por la conexión directa entre el capilar procedente de la columna y el capilar dirigido hacia la zona de ionización empleando para tal efecto una vía de conexión directa (Conector Capilar 999-Link-5).

De acuerdo con los valores de longitud y diámetros de capilar estimativos, se procede a la adquisición del más parecido comercialmente que es un tubo de sílice fundida CP99933C  $D_i = 0,25$  mm. Se trata de un tubo desactivado ya que debe trabajar únicamente como portador, al ser de diámetro ligeramente superior y de acuerdo con las expresiones que indican que un aumento en la longitud de paso se traduce en una pérdida de presión, se adquieren 20 metros de dicho capilar. Al someter a vacío el sistema con un caudal de nitrógeno circulando por el capilar de 1 mL/min, las presiones respectivas que se obtienen en las cámaras de ionización y de TOF son de  $8,9 \times 10^{-6}$  y  $6,3 \times 10^{-6}$  mbar respectivamente, presiones que no hacen factible el poder medir pues según se indicó estos valores crean una muy baja relación S/N además de contribuir a un deterioro exponencial de las placas microcanales. Por lo tanto, se pasa a un diámetro inferior de 0,1 mm, se utilizan 10 metros (tubo de sílice fundida CP99933C), la presión en estas condiciones es de  $2,1 \times 10^{-6}$  (cámara de ionización) y  $1,7 \times 10^{-6}$  (cámara de tiempo de vuelo) con flujo de 1 mL/min de nitrógeno a temperatura ambiente, valores que se verán disminuidos en función de la rampa de temperaturas seleccionada.

Si bien el hecho de haber disminuido la sección en el tramo que va hacia la cámara de ionización soluciona el problema de la presión, no proporciona buenas señales.

A raíz de todos estos resultados, se optó por una disposición consistente en realizar la separación cromatográfica en una columna de diámetro de capilar interno 0,1 mm (Columna capilar Factorfour VF-5MS 10M×0,10 mm  $D_i$   $d_f = 0,40$ ), ya la propia columna crea la suficiente caída de presión como para permitir una conexión con una longitud de capilar

adicional de aproximadamente 62 cm entre el cromatógrafo y el sistema REMPI-TOFMS, y será esta disposición con la que se obtendrán los resultados de la técnica GC-REMPI-TOFMS. Las características del capilar que va dirigido hacia la cámara de ionización son: tubo de sílice fundida desactivado CP99933C de 0,25 mm de diámetro interno. Dado que la caída de presión se produce en su totalidad en la columna cromatográfica se acoplaron ambas técnicas con capilar de mayor diámetro que el de la columna con el fin de obtener una señal más intensa.

En esta disposición se conecta la columna con el capilar dirigido por la conexión de unión a través de una conexión (conector de unión de columnas 999-Link-5) de modo que no permite simultanear la medida, por lo que para obtener los resultados haciendo uso exclusivamente del cromatógrafo de gases hay que obstruir la conexión de unión con un capilar ciego de modo que el sistema de ionización continúe estanco.

Las moléculas, en estado gaseoso, deben ser ionizadas, en condiciones óptimas de vacío, mediante el proceso REMPI-TOFMS. El proceso de ionización se puede llevar a cabo mediante radiación a 266 nm para lo cual se empleó el BrilliantB, láser que había que sincronizar adecuadamente con el máximo de señal, empleándose para tal efecto una caja de sincronización de pulsos. En el caso de querer ionizar en otro rango de longitudes de onda, se hacía uso del sistema láser de colorante (Continuum ND60) y doblado en frecuencia mediante un sistema doblador (INRAD-AT-III-UV) según se comentó en el apartado 2.1 del sistema experimental, para ello sólo hay que llevar el haz de radiación láser doblada a la longitud de onda deseada a la cámara de ionización mediante una serie de espejos y/o prismas. El hecho de ionizar con radiación 266 nm es para tener la mayor información posible de los compuestos presentes en el gas efusivo.

Debido a que a la salida del capilar se tiene un gas efusivo, habrá puntos de mayor densidad molecular y por consiguiente que proporcionen mayor intensidad de señal. La configuración óptima de medida se encontró variando la distancia del capilar de salida respecto a la primera placa aceleradora, para ello había que desplazar longitudinalmente la conexión entera hasta lograr la distancia óptima por sucesivas mediciones en diferentes configuraciones. Posteriormente, se optimizan los parámetros láser.

### 2.2.1. CONDICIONES DE MEDIDA.

Se inyecta la muestra, en estado líquido, en cantidades de 1  $\mu\text{L}$  por análisis. La temperatura en la línea de transferencia se mantiene en todo momento aproximadamente constante a  $100^{\circ}\text{C}$ . La rampa de temperatura seleccionada, en el cromatógrafo de gases, para el caso concreto del compuesto de trans-estilbeno es:

Etapa	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	v ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	t (min)	t <sub>total</sub> (min)
Inicial	220	-	2,00	2,00
1	310	40,0	6,00	10,00

Tabla 2.5. *Condiciones experimentales de la rampa de temperatura programada elegida para la molécula de trans-estilbeno.*

Caudal de gas portado ( $\text{N}_2$ ) = 1 mL/min.

P (Cámara de Desorción) =  $1,7 \times 10^{-6}$  mbar

P (Cámara de Ionización) =  $9,7 \times 10^{-7}$  mbar

La salida del capilar está posicionada justo en el orificio central de la primera placa aceleradora.

$E_i = 390 \mu\text{J}/\text{pulso}$ .

Los voltajes aplicados a las diferentes placas aceleradoras son los dados en la tabla 2.2.

### 2.3. MÁQUINA DE HACES MOLECULARES.

El hecho de someter una sustancia o molécula a una expansión supersónica a vacío provoca una congelación de los modos vibro-rotacionales en la misma y por consiguiente los espectros de masas obtenidos mediante esta técnica presentan una relación S/N excelente.



Este aspecto ayuda de manera significativa a la hora de proceder en alguna asignación de bandas.

Un gas, He, a alta presión se mezcla con la muestra vaporizada por láser, y a continuación esta mezcla se expande a una zona de baja presión, produciéndose un flujo supersónico. Estos procesos tienen lugar en la cámara de expansión. Sólo la parte central del flujo supersónico pasa por un colimador tronco-cónico a una segunda cámara formándose de esta manera el haz molecular. En esta segunda cámara, llamada cámara de detección, se detectan y se analizan las especies de interés contenidas en el haz molecular, utilizando la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo.

La cámara de detección junto con el tubo del espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, es bombeada por dos sistemas de bombeo, ubicados en la parte inferior de la cámara y la parte superior del tubo de vuelo, respectivamente. El primero consta de una bomba turbomolecular (Varian, mod 250, 250 L/s nominal) bombeada mediante una bomba rotatoria de dos etapas (Balzers, mod DUO016B, 16 m<sup>3</sup>/h). El segundo consta de una bomba turbomolecular (Varian, mod 300, 300 L/s nominal) bombeada por una bomba de membrana (Varian, mod MD60, 60 L/min nominal). Todo el conjunto mantiene una presión de trabajo de  $3 \cdot 10^{-7}$  mbar dentro de la cámara durante el experimento. Las dos cámaras pueden estar separadas con una válvula de guillotina.

La presión en el interior de las cámaras se mide utilizando medidores de tipo Penning (Balzer, mod IKR020). Estos medidores están conectados directamente con la unidad de control (Balzers TPG300). La figura 2.9 muestra una vista general de la máquina de Haces Moleculares.

Las moléculas que viejan en el haz supersónico al pasar a la cámara de detección son ionizadas, para lo cuál se hace uso del sistema láser de colorante (Continuum ND60) y doblado en frecuencia mediante un sistema doblador (INRAD-AT-III-UV). La radiación láser empleada para la ionización es llevada mediante un camino óptico a la cámara de detección donde se va a llevar a cabo la ionización de la muestra. En la figura 2.9 se puede observar un esquema general del sistema experimental empleado para la obtención de espectros haciendo uso de la técnica de Haces Moleculares.

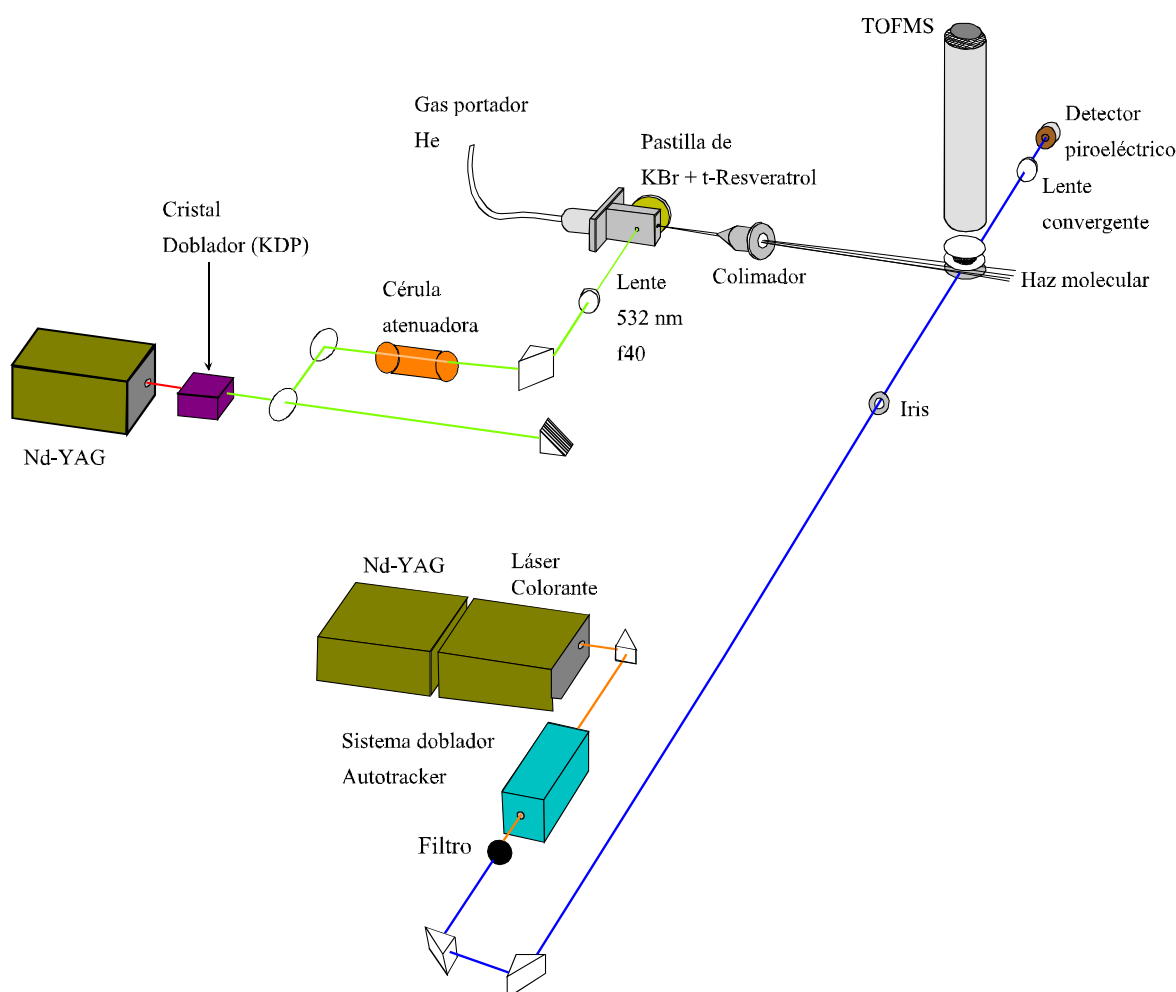


Figura 2.9. Vista general de la máquina de Haces Moleculares.

El sistema de vaporización de la muestra, que consta de una pastilla pegada sobre un disco rotatorio movido por un motor paso a paso, se lleva a cabo utilizando el segundo armónico (532 nm) de un láser de Nd:YAG pulsado (Continuum, mod. SureliteI). El haz del láser, que pasa al interior de la cámara a través de una ventana de cuarzo, es focalizado sobre la muestra con una lente convergente de 400 mm de longitud focal. Esta lente está ubicada en el exterior de la máquina y montada sobre un sistema de posicionamiento x-y para facilitar la alineación del láser.

La energía utilizada para la vaporización es del orden de 14 mJ/pulso de longitud de onda de 532 nm. La energía de salida del láser a 532 nm, en condiciones óptimas de voltaje de la lámpara de destello y de retraso entre los disparos de la lámpara de destello y el conmutador del factor Q, es de aproximadamente 200 mJ. En estas condiciones se obtiene la mayor estabilidad de energía del láser. Para trabajar en estas condiciones y obtener la energía

de vaporización necesaria, se ha colocado una célula rellena de una disolución de sulfato de cobalto en agua destilada en el camino óptico del láser con el fin de atenuar la energía por medio de agentes externos al propio láser.

Para poder detectar las especies contenidas en el haz en el espectrómetro de masas, estas han de estar ionizadas. Para ello se utiliza radiación sintonizable con la molécula de estudio interés para poder realizar su espectro REMPI, según se muestra en la figura 2.9 y de acuerdo a lo explicado en el apartado 2.1, la radiación que sale del sistema doblador (INRAD-AT-III-UV) es llevada por medio de un camino óptico hasta la entrada a la cámara de ionización. El haz es colimado con un iris antes de pasar al interior de la cámara por una ventana de cuarzo, donde se cruza con el haz molecular a 90°. Después del cruce, el haz del láser vuelve a salir de la cámara por otra ventana de cuarzo, lo que facilita la medida de su energía.

Los iones así formados son extraídos hacia el tubo del espectrómetro de masas y acelerados mediante un conjunto de placas y mallas electrostáticas. Este espectrómetro de masas (Comstock, mod. TOFMS-101) es de tipo tiempo de vuelo lineal, con una longitud del tubo de vuelo de 1 m y una resolución de masas de 1200. Los iones, una vez que hayan atravesado el tubo de vuelo, son detectados con un detector de dos placas de microcanales (Comstock Channel Plate, mod. CP-625/50B).

La señal procedente del detector de iones es visualizada y memorizada en un osciloscopio digital (Le Croy™ Digital Storage Oscilloscope, mod. LC334AM) de cuatro canales de entrada y un ancho banda de 500 MHz. Las señales adquiridas en el osciloscopio son transferidas a un ordenador a través de una interfase IEEE488.

Un generador de pulsos eléctricos dispara con diferentes retrasos los componentes pulsados del sistema experimental a partir de un pulso eléctrico maestro TTL, generado a una frecuencia de 10 Hz. A partir de este pulso, y con un conjunto de circuitos electrónicos de retrasos, se dispara la válvula pulsada, el láser de vaporización, el láser de ionización y finalmente la fuente que genera el pulso de alto voltaje para la placa de extracción del espectrómetro de masas por tiempo de vuelo. Además, se optimiza con la misma fuente la energía de todos los láseres, variando el retraso entre los pulsos de disparo de la lámpara de destello y del conmutador de factor Q para cada láser.

### 2.3.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

La concepción del habitáculo de la muestra precisa que sea un disco sólido, este hecho hace que la muestra deba ser previamente preparada para su análisis por esta técnica. La preparación de la muestra, será en forma de pastillas<sup>a</sup> para de esa forma poder ser introducidas en la máquina. Las diferentes pruebas que se llevaron a cabo con el fin de disponer de una pastilla consistente y no quebradiza desprendieron una composición de (285 mg de KBr + 15 mg de trans-resveratrol). Dichas pastillas, tienen una limitación en diámetro de 10 mm dado que es el mayor tamaño de pastilla que se puede conseguir con lo cual limitará mucho el tiempo de obtención de señal; se tienen señales intensas pero de menor duración que una pastilla con la misma composición y de diámetro mayor.

Una vez obtenida la pastilla se introduce, pegada sobre un soporte, en un compartimento de la cámara de desorción en la máquina de Haces Moleculares diseñada para tal efecto.

### 2.3.2. CONDICIONES DE MEDIDA.

En las tablas 2.6 y 2.7 respectivamente, se indican las condiciones experimentales de medida para la molécula de trans-resveratrol.

<b>Etapas</b>	<b>V</b>
Reflector	1900
Deflector	185
Placas Microcanales	-2000

Tabla 2.6. *Voltajes empleados en los experimentos con la máquina de Haces Moleculares.*

<sup>a</sup> Se agradece la elaboración de la pastilla a, José Hernández, responsable del CAI de Química-Física de la facultad de CC. Químicas de la UCM.

<b>Etapas</b>	<b>Retraso (<math>\mu</math>s)</b>
Válvula-LD	850
LI-LD	400

Tabla 2.7. Retrasos empleados en los experimentos con la máquina de Haces Moleculares.

## 2.4. CÁMARA DE ANOXIA.

Se diseñó una cámara con el fin de crear condiciones anóxicas para estudiar la evolución de determinados compuestos presentes en muestras naturales bajo dichas condiciones. Se construyó en el taller mecánico del Instituto Pluridisciplinar.

La cámara se realizó en acero inoxidable AISI 304 de capacidad aproximada 0,01 m<sup>3</sup>. Consta de dos bridas de metacrilato con el fin de tener una visión del contenido de la misma. Sendas bridas están roscadas en su centro con el fin de poder roscar unos racores (Swagelok ISO ss-6MO-1-2RS) para conexión a tubo de teflón de 6 mm. Uno de los tubos va conectado hacia la botella de gas nitrógeno seco intercalándose una válvula de dos vías (Swagelok ss-41S3MM) con el fin de no provocar una súbita sobrepresión en la cámara. Una válvula análoga a la anterior se coloca al final del tubo que sale de la otra brida con el fin de conectarla a una bomba de vacío que será la encargada de evacuar el aire contenido en la cámara. Para poder tener controlada la presión en todo momento, en la parte superior de la cámara se realiza una adaptación para incorporar un manómetro (Air Liquide presión -1-1,5 bar, racor VCR macho para tubo de 1/4"). En la figura 2.8 se muestra una visión de conjunto.

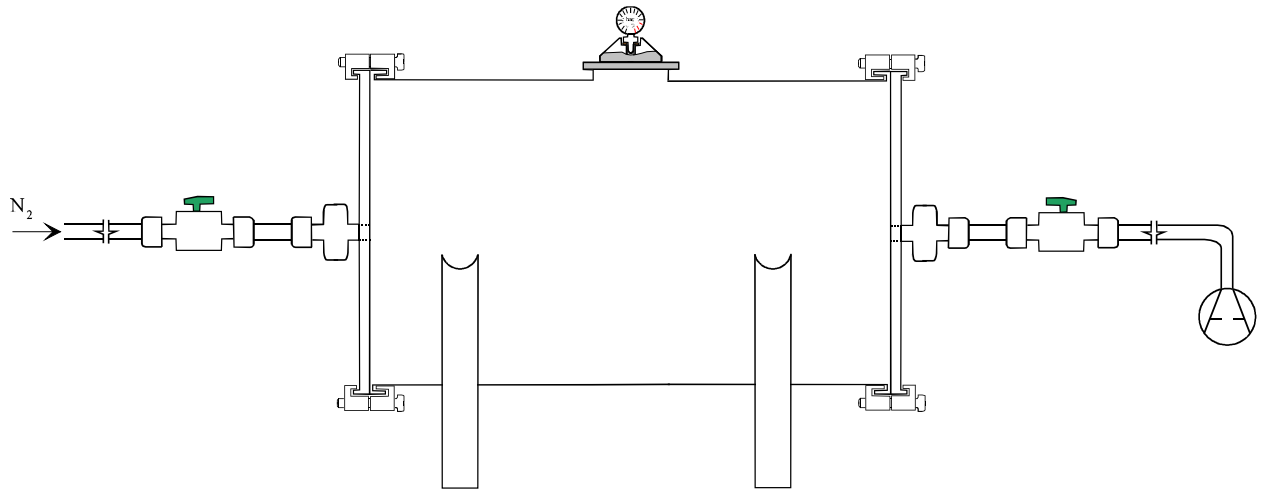


Figura 2.10. *Dispositivo experimental para los tratamientos de anoxia.*

### **2.4.1. CONDICIONES DE MEDIDA.**

Tal y como esta concebida la cámara, permite dos modalidades de medición:

- 1) Medición con un flujo continuo de gas.
- 2) Introducción de gas hasta sobrepresión.

Para nuestros propósitos, descartamos la posibilidad primera para trabajar solamente en las condiciones de introducir un gas a sobrepresión.

Las muestras introducidas eran racimos de uva que se sometieron a una sobrepresión de aproximadamente 1,2 bar de nitrógeno seco.

### **2.5. TÉCNICAS Y DETECTORES ADICIONALES EMPLEADOS EN ESTA TESIS.**

A continuación, se describen brevemente los equipos adicionales utilizados para la realización de los experimentos.

**Detector Piroeléctrico.**

Se ha utilizado un detector piroeléctrico (ED-100A Gentec) para medir las energías del láser de excitación y de ionización. Este detector consta de un cristal piroeléctrico provisto de electrodos y recubierto con una fina capa de un material que absorbe la luz. La energía del pulso láser absorbida es transferida al material piroeléctrico como un pulso de calor.

El material piroeléctrico tiene dipolos permanentemente orientados y muy sensibles a la temperatura. Una variación rápida de la temperatura del material altera la orientación de los dipolos. El retorno al equilibrio eléctrico del material produce una corriente eléctrica (transferencia de carga) entre sus electrodos. Esta corriente fluye a través de una resistencia de carga, conectada a los electrodos, y genera un voltaje con el valor máximo proporcional a la energía del pulso láser.

El detector piroeléctrico está calibrado, y tiene una sensibilidad típica de 125 V/J para una carga de 1 M $\Omega$ . Se pueden medir energías muy bajas del orden de 5  $\mu$ J en un rango espectral de 0,19  $\mu$ m hasta 40  $\mu$ m.

**Medidor de Alta Energía.**

Se ha utilizado un medidor de alta energía (Field Master<sup>TM</sup> Energy Meter) acoplado a un detector de pulsos piroeléctrico (LM-P5) para medir la energía del láser de desorción. Este medidor permite medir energías de 0,5 mJ hasta 10 J en un intervalo de longitudes de onda de 0,19 hasta 10,6  $\mu$ m (colocando el filtro de absorción adecuado IR-VIS-UV del detector).

**Fotodiodo Rápido.**

Para medir el retraso entre los pulsos del láser de desorción y del láser de ionización, se ha utilizado un fotodiodo rápido de silicio (Thorlabs, mod. FDS010). Este fotodiodo tiene un tiempo de respuesta de 1 ns y una respuesta espectral de 0,2  $\mu$ m hasta 1,1  $\mu$ m, y es, por tanto, apto para medir el retraso entre dos pulsos de láseres rápidos (unos nanosegundos de anchura) en el visible y en el ultravioleta.

### **Lámpara de Cátodo Hueco.**

Se ha empleado una lámpara de descarga estándar de tipo cátodo hueco (Sn/Ne lamp, Cathodeon) para calibrar los láseres de excitación en longitud de onda. La lámpara consta de un ánodo de tungsteno y de un cátodo hueco y cilíndrico de estaño, encerrados herméticamente en un tubo de vidrio con un gas inerte (Neón) a una presión inferior a  $10^{-5}$  mbar.

Esta lámpara permite calibrar los láseres en longitud de onda utilizando el efecto optogalvánico en una descarga de gas a baja presión, tal y como se produce en la lámpara de cátodo hueco aplicando un alto voltaje entre el ánodo y el cátodo. La corriente de descarga de la lámpara varía cuando la longitud de onda de un láser de excitación es sintonizada con una transición electrónica de cualquier átomo presente en la región de descarga.

Esta variación de la corriente puede ser medida y registrada directamente utilizando un circuito electrónico apropiado, mientras se cambia la longitud de onda del láser.

La población de iones en la zona de descarga evoluciona según se excitan estados electrónicos de los átomos, ya que la probabilidad de ionización cambia según el estado electrónico en el que se encuentra un átomo. Esto da lugar a la variación de la corriente de descarga. El espectro de una lámpara de cátodo hueco permite una calibración muy precisa de los láseres, ya que la anchura de las líneas de transición atómica en esta lámpara es del orden de 0,002 nm.

### **Espectrofotómetro UV/VIS.**

Con la finalidad de obtener el espectro de absorción de una molécula para, entre otras cosas, tener delimitado la región de máxima absorción y por consiguiente poder tener acotado un intervalo para buscar su espectro REMPI, se ha empleado un espectrofotómetro (JASCO V-530).

Consta de dos compartimentos para ubicar ambas cubetas de paso óptico 10 mm (Hellma 101-QS), en una de ellas se introducirá el disolvente puro y en la otra la muestra de modo que la medida final mostrará la absorción de la molécula aislada.



Los espectros se pueden obtener a diferente velocidad de scaneo y con una resolución máxima de 0,1 nm. Se puede trabajar tanto en absorbancias como en transmitancias.

### **FTIR.**

Se ha hecho uso de un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (Shimadzu FTIR-8400 S) con el fin de obtener un espectro vibracional de algunas moléculas.

La ventaja que presenta el FTIR con respecto a espectrómetros dispersivos son: Mide todas las longitudes de onda simultáneamente lo que implica medidas en menor tiempo y una disminución en el ruido de fondo proporcional a ese ahorro temporal.

El hecho de presentar aperturas circulares hace que la cantidad de luz sea mayor dado que en los dispersivos la entrada consta de rendijas. La medida de la conductancia óptica muestra que es mayor para los FTIR que para los espectrómetros que hacen uso de una red de difracción.

Debido a la posición de la muestra, colocada debajo del modulo de interferometría, hace que la dispersión sea despreciable para los FTIR.

Los espectros se obtuvieron por la técnica de transformada difusa, consistente en depositar en un pequeño contenedor la muestra estudio mezclada con KBr, siempre en un porcentaje de muestra inferior al 5 % para que no se sature la señal.

### **3. RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.**

### 3.1. DESARROLLO INSTRUMENTAL Y MEJORA DE LA TÉCNICA LD-REMPI-TOFMS.

A lo largo del trabajo desarrollado en esta tesis doctoral, se han introducido diversas mejoras en el sistema experimental con el fin de aumentar la intensidad de señal obtenida. El sistema experimental desarrollado para el análisis por LD-REMPI-TOFMS permite optimizar por separado los procesos de desorción e ionización, por lo que se pueden modificar numerosos parámetros de forma independiente con el fin de optimizar el sistema.

En este apartado se va a describir la mejora introducida en la parte de la desorción para la técnica de LD-REMPI-TOFMS. Para el caso concreto de una cantidad dada de trans-resveratrol puro y en las condiciones de medida experimentales óptimas, un espectro característico de la molécula de trans-resveratrol está representado en la figura 3.1.

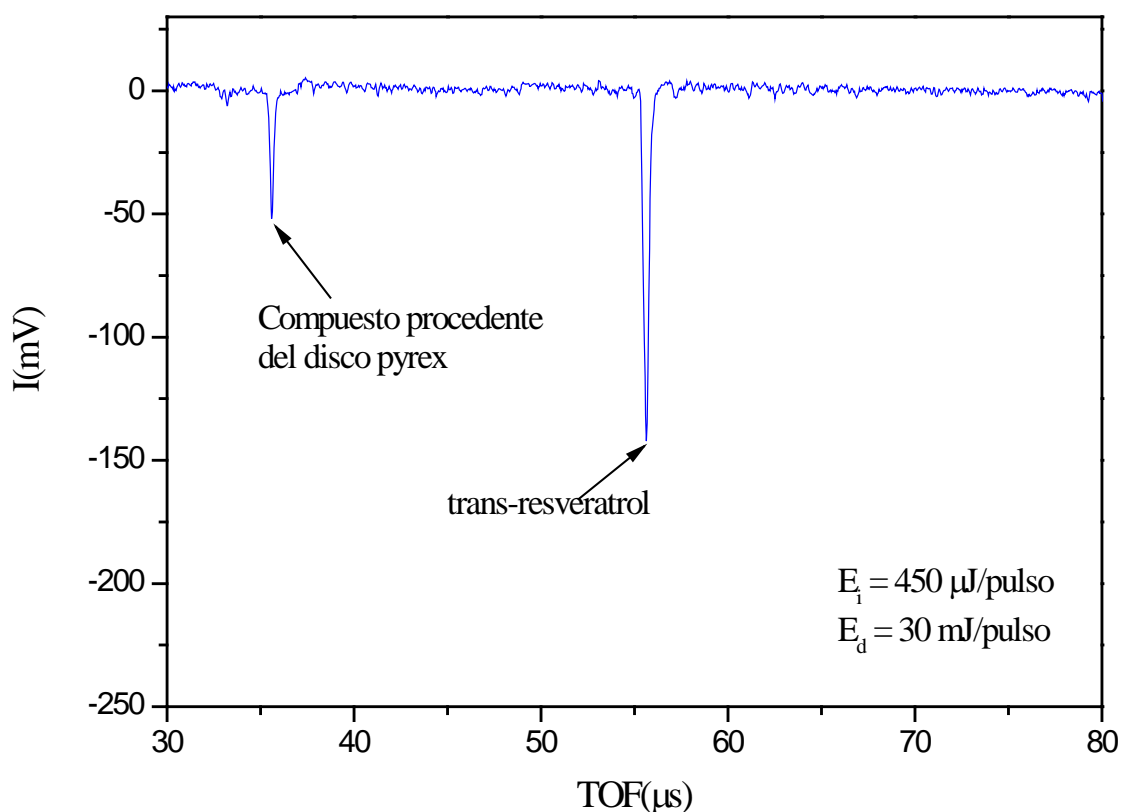


Figura 3.1. Desorción delantera con vástago Varian 316 de una disolución de  $3 \mu g$  de trans-resveratrol + 30 mg de Zn en acetona.

De todas las modificaciones realizadas: aumento de los diámetros de los orificios de algunas placas aceleradoras, aislamiento térmico del motor con una carcasa de teflón, derivación del sistema a masa, etc., la de mayor relevancia experimental ha sido la sustitución del vástago (Varian 316) que proporcionaba movimiento ascendente-descendente por el vástago (Pfeiffer 243010-T) que presenta la posibilidad de giro alrededor del eje z. Este hecho pone de manifiesto que uno de los parámetros más importantes en el proceso de desorción es el ángulo que forma la muestra con la radiación láser incidente. Dicho ángulo ha sido optimizado, lo que ha permitido que se mejore en aproximadamente 2,5 veces la señal en trans-resveratrol según se desprende de la comparación de las figuras 3.1 y 3.2 respectivamente.

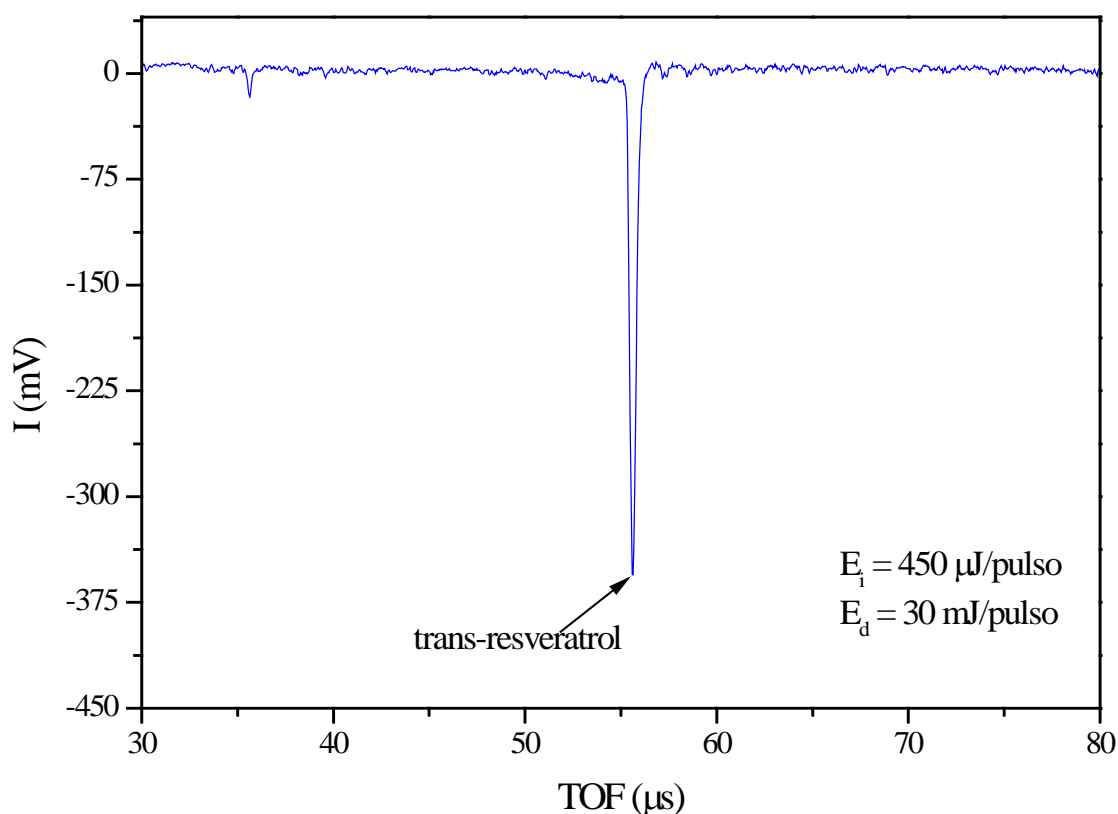


Figura 3.2. Desorción delantera con vástago PFEIFFER 243010-T de una disolución de 3  $\mu g$  de trans-resveratrol + 30 mg de Zn en acetona.

### 3.2. ESPECTROSCOPIA MOLECULAR.

Como se ha indicado anteriormente, el espectro REMPI es fundamental desde el punto de vista analítico para determinar la longitud de onda resonante a la que podemos producir la

ionización selectiva de una molécula específica. Sin embargo, la información contenida en dicho espectro también permite obtener una información muy detallada de los niveles energéticos de la molécula y de las diversas transiciones entre ellos, permitiendo por lo tanto en muchos casos estudios espectroscópicos de la molécula de interés.

Como consecuencia de la gran selectividad que presenta la técnica REMPI y la gran resolución que presenta el TOFMS en la detección de iones, se han obtenido una serie de bandas en el intervalo REMPI de la molécula de trans-resveratrol y con el fin de poder disponer de mayor información al respecto se han comparado las bandas obtenidas por la técnica LD-REMPI-TOFMS con la obtenida por una máquina de Haces Moleculares con expansión supersónica en donde el haz molecular recorre una mayor distancia hasta el punto de ionización además de estar sembrado con un gas ligero lo que produce trans-resveratrol más frío vibro-rotacionalmente y por consiguiente poder medir un espectro con mayor resolución y caracterizar, con ello, mejor su espectro vibro-rotacional.

Se ha continuado con una serie de aplicaciones analíticas en donde se ha procedido a cuantificar el contenido de trans-resveratrol presente en una muestra natural de hoja de vid de la variedad Aledo y se ha comparado con el obtenido por medio de la técnica HPLC, para una misma cantidad de muestra, que resulta ser una técnica común en el análisis de moléculas muy polares como el trans-resveratrol.

El hecho de obtener valores precisos en el contenido de una molécula en particular ha llevado a seguir la evolución en el contenido de trans-resveratrol en experimentos conducentes a aumentar el contenido endógeno de trans-resveratrol en uvas mediante diversos tratamientos post-cosecha: principalmente anoxia y tratamientos a baja temperatura en atmósfera con elevada concentración de CO<sub>2</sub>.

Por último, tal y como se verá en la última parte de este apartado, la aplicación de extractos naturales obtenidos a partir de hoja de vid ha mostrado dar unos resultados muy beneficiosos en la conservación de la uva después de su recolección.

### **3.2.1. ESPECTRO REMPI DE LA MOLÉCULA DE *trans*-RESVERATROL.**

Según se comentó al comienzo de este apartado, la técnica LD-REMPI-TOFMS permite obtener espectros de las moléculas en sus diferentes estados vibracionales, por lo que un seguimiento del proceso para distintas longitudes de onda de excitación proporciona una información precisa de los diferentes estados energéticos y por consiguiente de sus estados vibracionales y máxime en longitudes de onda para las cuales la molécula es resonante en cuyo caso el disponer de una gran intensidad de señal facilita de forma importante el proceso de asignación. Un primer paso en la obtención del espectro REMPI de la molécula es hacer uso de la información que se desprende del espectro de absorción ultravioleta para la molécula en cuestión para seguidamente concretar el máximo de absorción en el intervalo obtenido previamente por el espectrofotómetro.

#### **3.2.1.1. RESULTADOS POR LD-REMPI-TOFMS.**

Se ha realizado un estudio por espectroscopia REMPI para determinar la máxima intensidad de señal para la molécula de *trans*-resveratrol. El espectro REMPI para la molécula de *trans*-resveratrol ya se ha estudiado<sup>165</sup> previamente por nuestro grupo, en un intervalo entre 301 y 308 nm con una resolución de 0,1 nm como se puede observar en la figura 3.3.

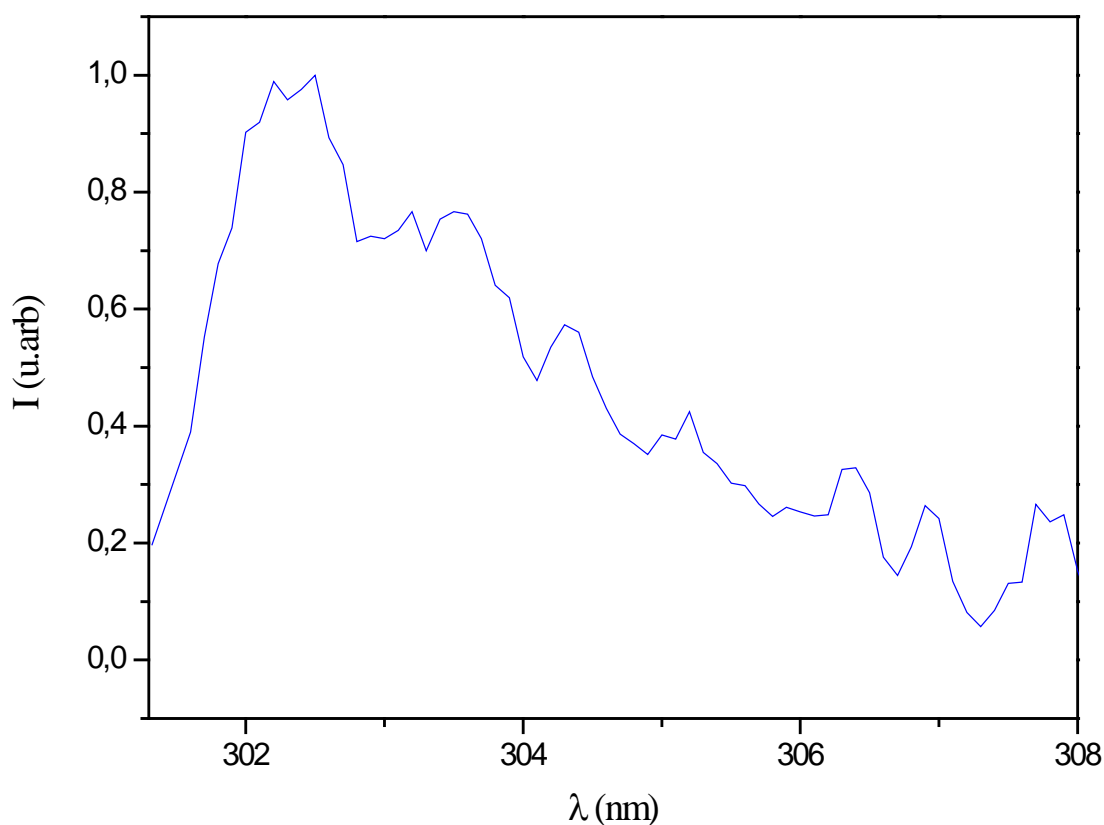


Figura 3.3. *Espectro REMPI en el intervalo 301-308 para la molécula de trans-resveratrol obtenido con una resolución de 0,1 nm.*

Debido a la gran congestión observada en este espectro, se decidió mejorar el mismo con una resolución mayor pero circunscribiéndose a un intervalo en torno a la banda de máxima absorción, es decir, entre 300,8 y 303 nm.

Para realizar el estudio espectroscópico de la molécula de trans-resveratrol, se depositaron 5  $\mu\text{g}$  de trans-resveratrol sobre una placa pyrex según el proceso descrito en el apartado 2.1. La muestra de esa forma depositada se desorbió con radiación del primer armónico procedente de un láser de Nd:YAG y posteriormente se ionizó con radiación láser de longitudes de onda comprendida en el citado intervalo. Para realizar el barrido, se emplea una función programada del sistema doblador (INRAD-AT-III-UV) descrito en el apartado 2.1, el barrido se efectuó con una resolución de 0,05 nm.

Debido al carácter bifotónico<sup>90</sup> del proceso de excitación láser de la molécula de trans-resveratrol, los espectros obtenidos se normalizaron con el cuadrado de la energía medida

mediante un detector piroeléctrico. Un espectro característico de esta molécula se puede apreciar en la figura 3.4.

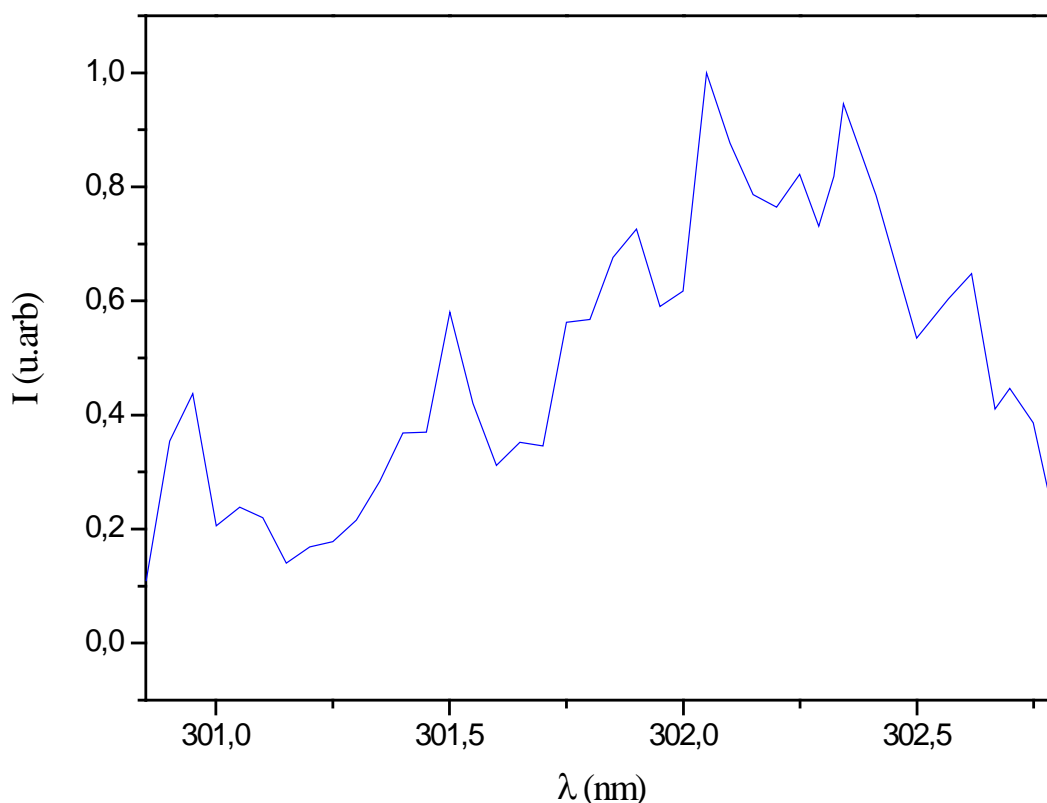


Figura 3.4. *Bandas vibracionales obtenidas de la desorción de trans-resveratrol por la técnica LD-REMPI-TOFMS.*

El hecho de obtener un espectro más resuelto proporciona un valor más preciso para el máximo de absorción que antes se estableció en  $302,1 \pm 0,1$  nm y ahora se ha encontrado que es  $302,05 \pm 0,05$  nm. Es interesante observar que el aumento en resolución da origen a conocer una estructura vibracional más completa para el intervalo de estudio, lo que permitirá un estudio más exhaustivo de la estructura vibro-rotacional del espectro.

### 3.2.1.2. RESULTADOS POR EXPANSIÓN SUPERSÓNICA.

Con el fin de obtener una resolución aún mayor se estudió la variación con la longitud de onda de la señal de la ionización bifotónica del trans-resveratrol obtenida en la máquina de Haces Moleculares con expansión supersónica descrita anteriormente.



Esta técnica permite obtener espectros mejor resueltos que con la técnica anterior debido, a la baja temperatura que se obtiene en este tipo de haces como consecuencia de que las moléculas desorbidas de la muestra están sembradas con un gas portador inerte, en este caso helio, que contribuye junto con la propia expansión a relajar aún más vibro-rotacionalmente las moléculas de la muestra. La colocación de un *skimmer* después de la expansión selecciona la parte más fría del haz lo que conduce a que prácticamente toda la población se encuentre en el nivel vibracional fundamental.

En el caso de la preparación de la muestra para poderla analizar en la máquina de expansión supersónica, se procedió, tras varias pruebas, a preparar una pastilla de trans-resveratrol en una matriz de KBr y Zn. El KBr como constituyente para dar consistencia a la pastilla y el Zn como elemento de mejora en la desorción del trans-resveratrol. Las cantidades de cada uno de los componentes de la pastilla quedan reflejados en la tabla 3.1.

Componente	M (mg)
KBr	200,9
trans-resveratrol	40,0
Zn	10,1

Tabla 3.1. *Composición de la pastilla* a analizar por la máquina de Haces Moleculares.

Dicha pastilla se introdujo, de la manera que se ha descrito en la parte dedicada al sistema experimental, en la cámara dispuesta a tal efecto para una expansión supersónica. Para su vaporización se empleó un haz láser de longitud de onda correspondiente al segundo armónico de un láser de Nd-YAG, 532 nm, que mostró presentar un mayor rendimiento que la radiación infrarroja a 1064 nm.

La ionización de los componentes del haz supersónico, procedente de la vaporización de los elementos constituyentes de la matriz, se llevó a cabo con longitud de onda que cubrió el intervalo correspondiente a un intervalo de la región de máxima señal del trans-resveratrol, esto es, dentro de su espectro REMPI, anteriormente caracterizado.

La señal obtenida era lo suficientemente intensa como para trabajar con ella sin problemas, como se puede observar en la figura 3.5.

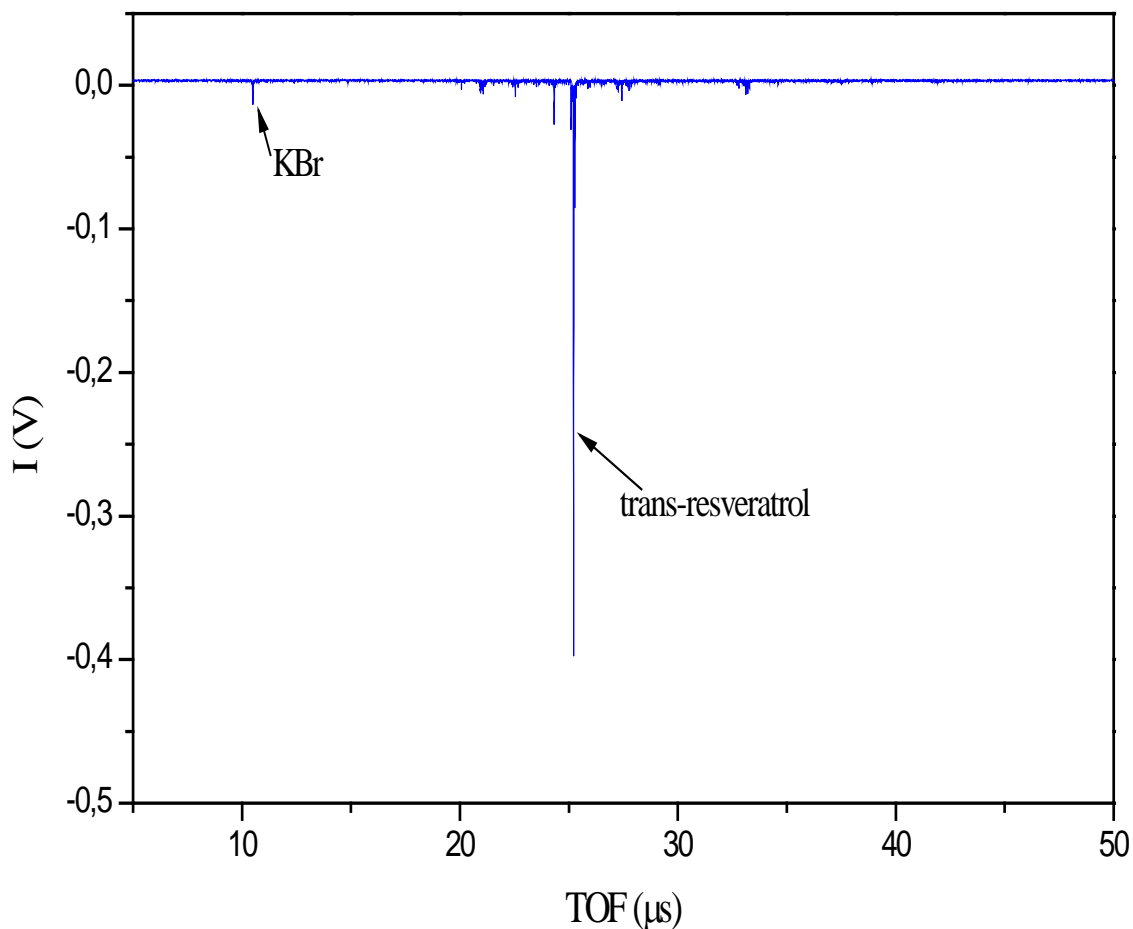


Figura 3.5. Espectro obtenido por la máquina de haces moleculares para la molécula de *trans-resveratrol*.

Una vez que se ha optimizado el sistema experimental para la molécula de estudio, se realizó el barrido en el intervalo de longitudes de onda establecido de 300,8 a 303 nm. Para ello, tal y como se describió en el apartado 2.3.2, se tomaron los espectros correspondientes al proceso de ionización en el intervalo anteriormente referido. La señal de esta manera obtenida se normalizaba con el cuadrado de la energía. El resultado correspondiente a dicho barrido se muestra en la figura 3.6.

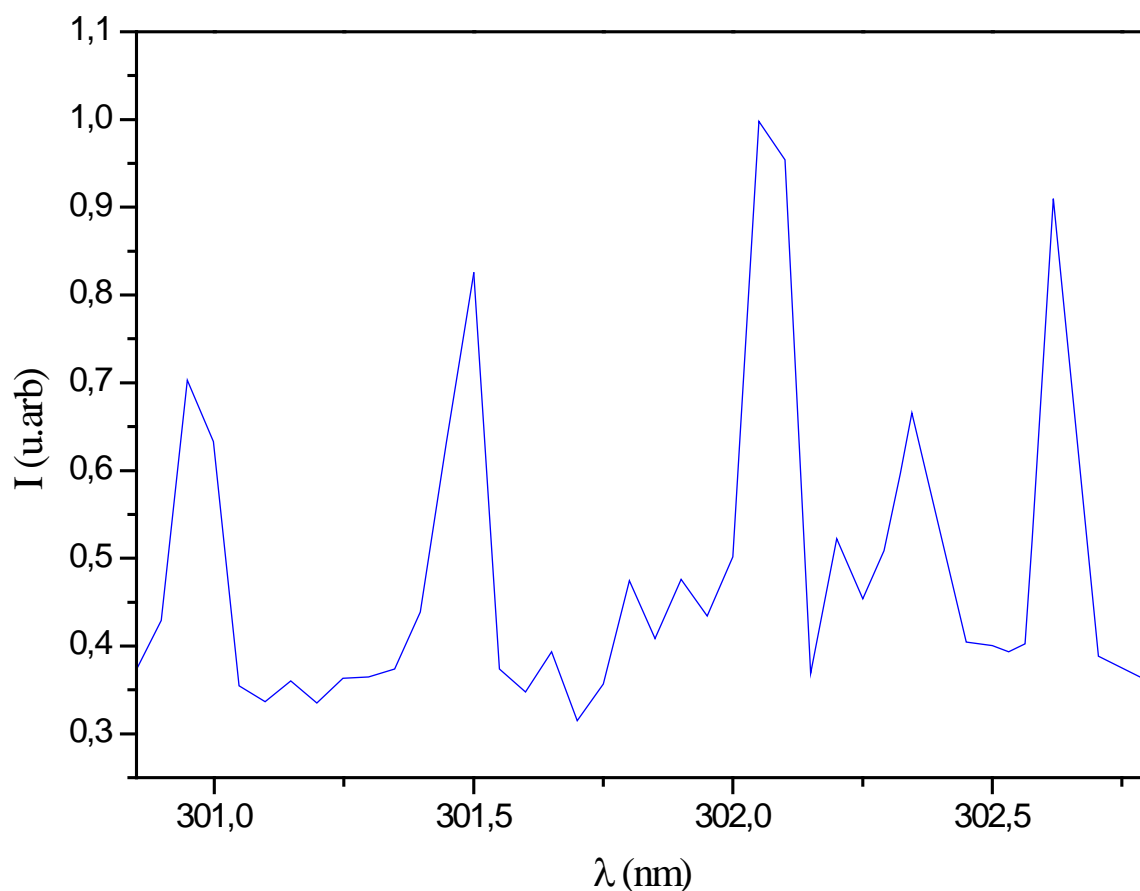


Figura 3.6. *Espectro REMPI para la molécula de trans-resveratrol en el intervalo 300,8-303 obtenido por medio de la máquina de Haces Moleculares.*

Nótese la mayor resolución de este espectro comparado con el de la figura 3.4. A partir del espaciado obtenido para las bandas en sendos espectros, se puede obtener información relativa a los modos vibracionales para la molécula de trans-resveratrol. Los cálculos referentes a la temperatura del haz supersónico indican que están por debajo de la barrera de isomerización, como se verá en el capítulo de discusión de este trabajo.

### ***3.2.2. ESPECTRO VIBRACIONAL POR FTIR DE LA MOLÉCULA DE trans-RESVERATROL Y RELACIONADOS.***

Cualquier molécula puede ser identificada en función de su espectro de vibración, en donde aparecen los modos de vibración característicos presentes en dicha molécula en cuestión. Este hecho ha servido como motivación para obtener el espectro de infrarrojo para la molécula de trans-resveratrol y el de otra molécula muy similar al trans-resveratrol pero sin

los grupos OH, el trans-estilbeno, con el fin de poder realizar un estudio en profundidad de las bandas obtenidas para la molécula de trans-resveratrol y proceder a asignar dicha vibración a un modo concreto.

Para obtener los espectros de IR de las moléculas se hizo uso de un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Shimadzu FTIR-8400 S. Al tratarse de un espectrómetro por transformada de Fourier su funcionamiento está basado en medidas interferométricas a las que aplica un algoritmo de transformada de Fourier lo que redundará en una mayor potencia con respecto a otros espectrómetros de infrarrojo ya que ahorra mucho tiempo<sup>185</sup> pues mide todas las longitudes de onda simultáneamente, proporciona una mayor intensidad de señal, ya que la conductancia de los interferómetros es mayor que los basados en redes de difracción<sup>186</sup>, mayor resolución y mayor estabilidad de la señal<sup>187</sup>. Como algoritmo de apodización de señal se empleó el algoritmo de Happ-Genzel.

Para obtener el espectro de infrarrojo de muestras sólidas como las empleadas, se hizo uso de la técnica de reflectancia difusa consistente en depositar una mezcla de la sustancia a medir con KBr en proporción tal que la sustancia que se quiere analizar no esté en una cantidad mayor al 5% en la mezcla<sup>188</sup> con el fin de no saturar el espectro. Dicha mezcla se homogeniza haciendo uso de un mortero de agata que debido a su dureza evita posibles contaminaciones de mezclas previas. Una vez hecha la mezcla se deposita en un contenedor de acero inoxidable dispuesto para tal efecto que a su vez se coloca en un soporte sobre el que incidirá la radiación infrarroja que será la que se analice y proporcione la información que buscamos. El hecho de emplear un FT-IR en la obtención de los espectros de IR va a permitir poder promediar en gran medida la señal por la obtención de un elevado número de espectros sin que ello implique un consumo excesivo de tiempo de análisis.

En la figura 3.7 se puede observar el espectro de infrarrojo para la molécula de trans-resveratrol obtenido por FTIR a partir de la técnica de reflectancia difusa. Para ello se ha empleado una resolución nominal de  $4\text{ cm}^{-1}$  y se efectuó el almacenamiento de 256 interferogramas previo paso a la transformación por Fourier haciendo uso de un algoritmo de apodización triangular.

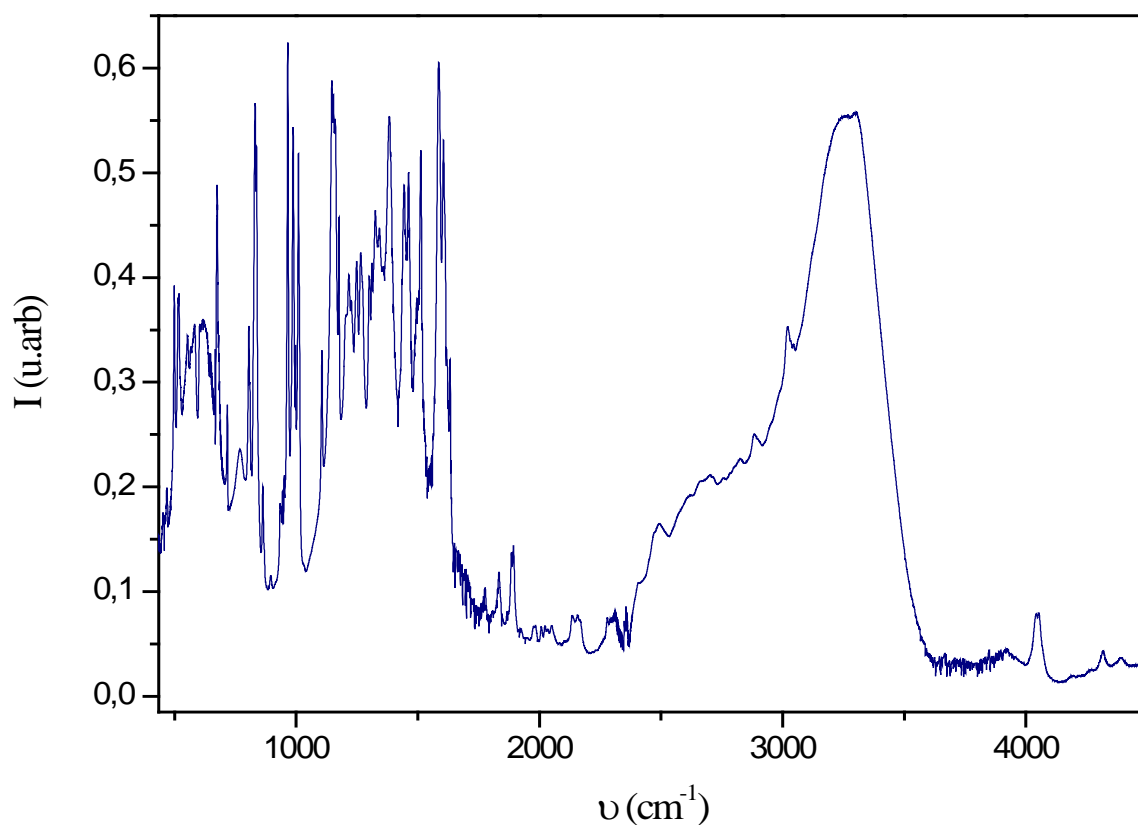


Figura 3.7. *Espectro FTIR de la molécula de trans-resveratrol por la técnica de reflectancia difusa.*

Se ha obtenido igualmente un espectro por FTIR de la molécula de trans-estilbeno que es muy similar a la de trans-resveratrol excepto por los –OH, como se puede observar en la figura 3.8.

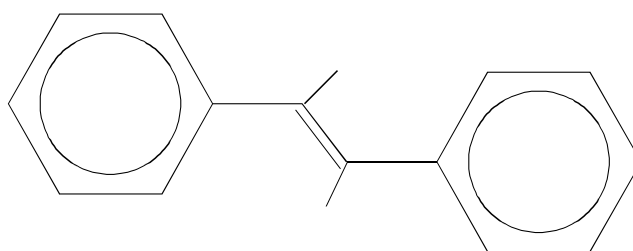


Figura 3.8. *Estructura de la molécula de trans-estilbeno.*

Dado que la molécula de trans-estilbeno se encuentra más documentada en la bibliografía y debido a la similitud en la estructura de ambas moléculas, los datos espectroscópicos del trans-estilbeno han servido como primera aproximación para la

asignación de las bandas a modos concretos en la molécula de trans-resveratrol. El espectro obtenido por FTIR a partir de la reflectancia difusa para la molécula de trans-estilbeno se puede observar en la figura 3.9.

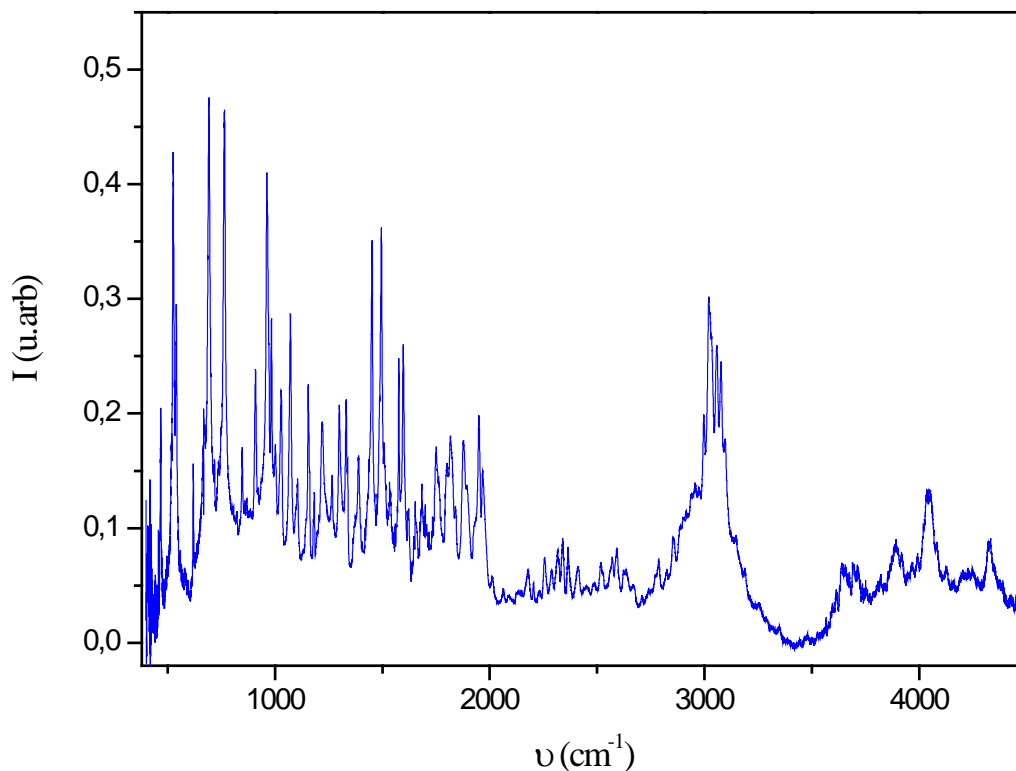


Figura 3.9. *Espectro FTIR de la molécula de trans-estilbeno por la técnica de reflectancia difusa.*

### 3.3. APLICACIONES ANALÍTICAS.

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el poder obtener espectros muy resueltos de la molécula de análisis en cuestión ha llevado a realizar toda una serie de experimentos analíticos del compuesto de trans-resveratrol ya sea con fines comparativos como para magnificar la evolución concreta en diversos tratamientos en muestras biológicas.

#### 3.3.1. *DETECCIÓN DE trans-RESVERATROL EN MUESTRAS NATURALES MEDIANTE LA TÉCNICA LD-REMPI-TOFMS.*

Mediante esta técnica, es posible detectar trans-resveratrol en muestras de distinta naturaleza y en matrices de distinta complejidad. Algunos espectros se pueden observar para

la Bistorta del Japón y la piel de la uva, si bien a lo largo del capítulo dedicado a resultados se observarán para otro tipo de muestras como son la hoja de vid y el vino.

Para obtener el espectro de piel de uva de la variedad Aledo, se prensó la piel correspondiente a 6 uvas, proporcionando una cantidad de 2 mL, siguiendo el proceso descrito en el apartado 2.1.1 de modo que una vez obtenido el aceite esencial procedente de las mismas, se mezcló con una cantidad de 30 mg de cinc y se depositó sobre la placa pyrex que se dejó secar en campana.

Una vez que la placa estaba seca, lo cuál se podía apreciar de forma visual, se introdujo en la cámara de desorción para proceder al análisis de la muestra. En este tipo de muestras, el promedio espectral se tuvo que rebajar de 400 a 200 debido a que se trataba de una matriz muy densa y por consiguiente la presión óptima de trabajo de las placas microcanales de nuestro espectrómetro de tiempo de vuelo, en caso de haber empleado un mayor número de promedios de la muestra, se habría visto rebasada en cada impacto de desorción con el consiguiente daño y deterioro de las mismas.

Para el caso de la piel de la uva, en la figura 3.10 se puede observar un espectro de masas para la piel de uva.

Se puede realizar una estimación del contenido de trans-resveratrol para esta muestra de uva en base a la intensidad que proporciona una cantidad conocida de trans-resveratrol en las mismas condiciones de desorción e ionización. Con el fin de dar una estimación del contenido depositado sobre la placa se procedió a la diferencia de pesada entre la placa vacía y la placa con muestra resultando ser de 1,897 gramos que están depositados sobre una superficie de 1963 mm<sup>2</sup>, ya que el diámetro de la placa pyrex es de 5 cm. El láser de ionización incide sobre un área de 7 mm<sup>2</sup>, el diámetro del haz láser de ionización es de 3 mm y presenta un spot circular. Con estos valores, conocidas que las áreas de pico del trans-resveratrol en el espectro patrón y el de la uva son 385,25 mV $\times$  $\mu$ s y 545,44 mV $\times$  $\mu$ s respectivamente se obtiene un valor de 12,9 mg de trans-resveratrol en dicha placa. No deja de ser una estimación con el fin de conocer la magnitud del compuesto de interés contenido en la muestra; en dicha estimación se han ignorado efectos como los efectos matriz que solamente se podrían descartar si se efectuase una recta de adiciones estándar como se ha hecho en otros casos.

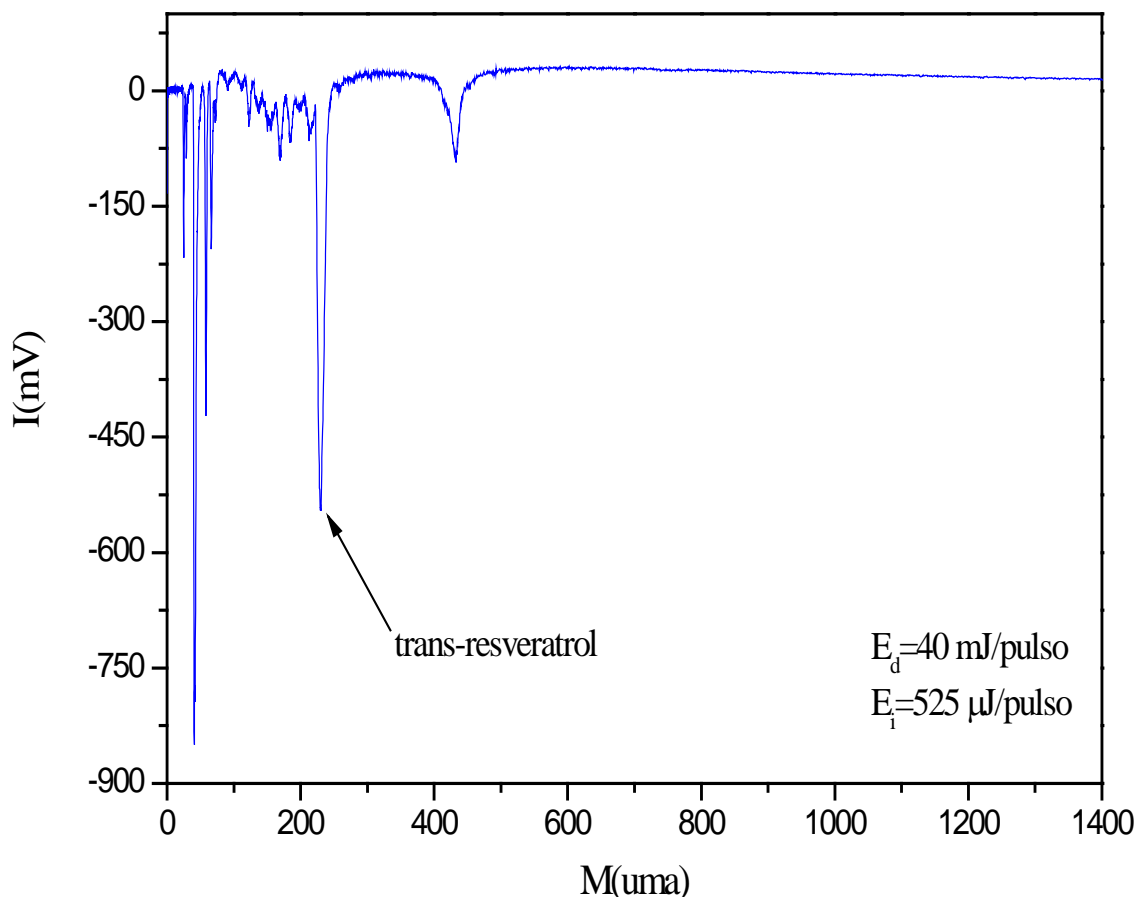


Figura 3.10. Espectro de masas típico de piel de uva obtenido por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS.

Otro ejemplo de análisis directo se encuentra en la Bistorta del Japón, cuyas raíces son muy empleadas como planta medicinal debido a sus propiedades antiinflamatorias y su contenido en agentes antioxidantes como el trans-resveratrol<sup>189,190</sup>. La muestra de raíz de bistorta procede de la maceración directa en etanol, de pureza HPLC, del producto comercial durante 10 días. Una vez transcurrido el periodo de maceración, el espectro correspondiente a la bistorta se obtiene por deposición directa del extracto sobre la placa pyrex haciendo uso del aerógrafo, necesitándose para ello 0,5 mL de extracto mezclado con 30 mg de Zn. La diferencia de pesada entre la placa con muestra y sin muestra es de 97,4 mg que va a servir para estimar de forma aproximada el contenido de trans-resveratrol en la muestra.



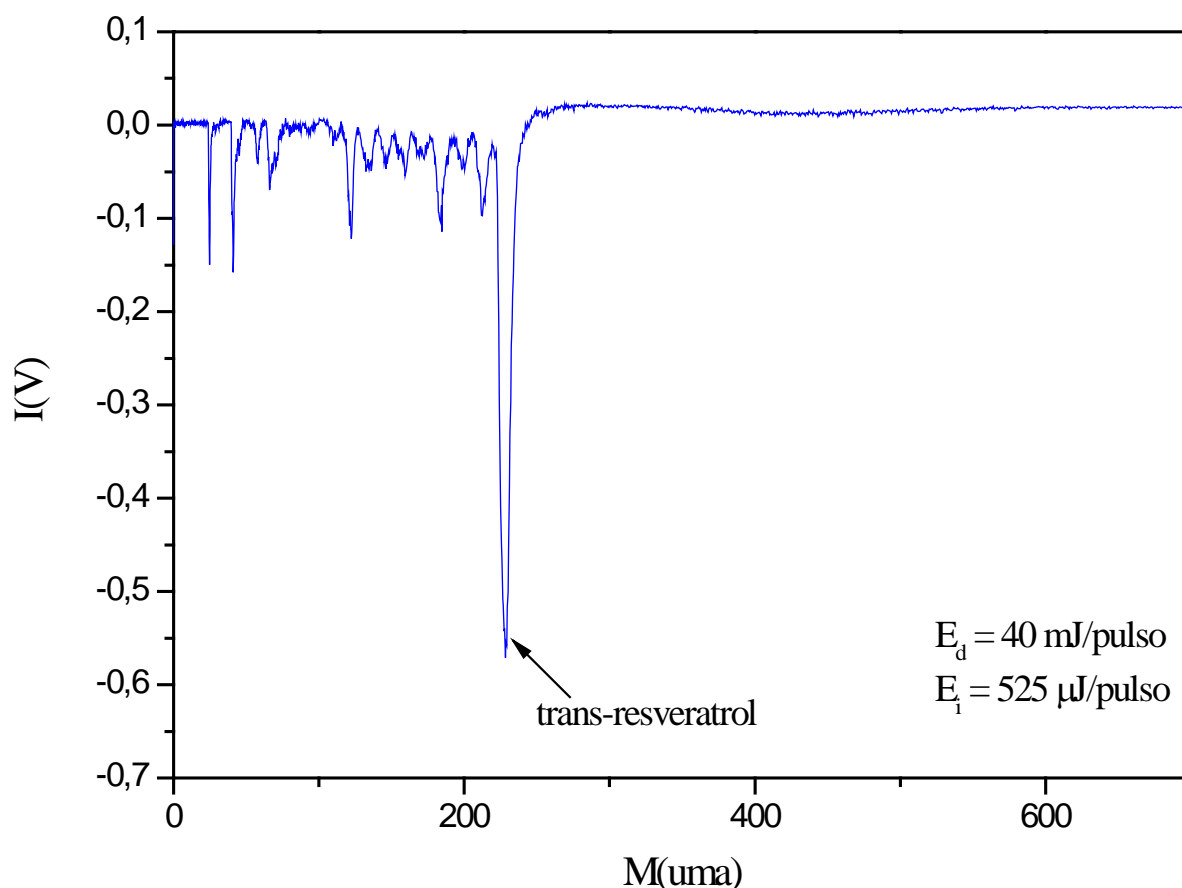


Figura 3.11. *Espectro de masas típico de bistorta obtenido por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS.*

Análogamente al caso anterior y de manera aproximada, se puede realizar una estimación en el contenido de trans-resveratrol para esta muestra de Bistorta del Japón en base a la intensidad que proporciona una cantidad conocida de trans-resveratrol en las mismas condiciones de desorción e ionización. Análogamente a como se procedió en el caso anterior, conocidas que las intensidades de trans-resveratrol para el espectro patrón y el de la uva son  $385,25 \text{ mV} \times \mu\text{s}$  y  $571,3 \text{ mV} \times \mu\text{s}$  respectivamente se obtiene un valor de 13,17 mg de trans-resveratrol en dicha placa.

### 3.3.2. COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS DE *trans-RESVERATROL* POR LAS TÉCNICAS LD + REMPI-TOFMS Y RP-HPLC.

Con el fin de mostrar las ventajas y limitaciones del análisis por LD+REMPI-TOFMS, se ha realizado una comparación crítica de dicha técnica con la técnica generalmente

empleada para el análisis de dicho compuesto en muestras vegetales: HPLC. En concreto, se determinó el contenido en trans-resveratrol de una misma muestra de un extracto etanólico obtenido a partir de hoja de vid, tanto por HPLC en fase inversa con detección fluorimétrica como por nuestro método por ionización láser resonante acoplada con la espectrometría de masas.

Como patrón se ha empleado trans-resveratrol comercial de Sigma-Aldrich. Las disoluciones patrones de trans-resveratrol se preservaron del contacto de la luz y del calor, almacenándose en la oscuridad a -4 °C. Como muestra natural se empleó hoja de vid de la variedad Aledo; dicha hoja se sometió a un proceso de maceración en etanol previa trituración con el fin de aumentar la sección de contacto, resultando un total de cuatro kilos de hoja en 8 litros de etanol, permaneciendo durante cuatro semanas con el fin de extraer el trans-resveratrol de la misma. Con el fin de tener una aproximación de la evolución del proceso, se extraían 3 mL cada dos días para obtener su espectro de UV-Visible hasta llegar a la curva de saturación. El proceso de maceración se llevó a cabo a temperatura ambiente y en condiciones de total oscuridad con el fin de no promover la isomerización cis-trans resveratrol<sup>191,192</sup>. Transcurrido el proceso de maceración, se procedió a su filtración y el filtrado se empleó tanto en el análisis por RP-HPLC<sup>a</sup> como en el LD-REMPI-TOFMS. Las muestras que se proporcionaron para el análisis se mantuvieron protegidas de la luz con el fin de evitar isomerización fotónica inducida.

El sistema cromatográfico constaba de los siguientes componentes: un cromatógrafo líquido que emplea una bomba PU 1580 y un controlador de gradiente de Jasco LG-1580-02, un puerto de inyección Rheodyne 7725 con capacidad de 20 µL, un espectrómetro luminiscente Perkin-Elmer LS 30 y una estación de trabajo Biocrom 2000-3.0 de Micron Analítica S.A. La separación del trans-resveratrol de la muestra natural se llevó a cabo con una columna Tecknokroma Cromasyl C<sub>18</sub> (150 × 4,6) MM, 5 µm junto con columna de fase estacionaria de la misma composición a temperatura ambiente. Para filtrar las disoluciones se

---

<sup>a</sup> Los resultados obtenidos por la técnica de HPLC proceden de un estudio llevado a cabo por la profesora M<sup>a</sup> Jesús Santos y su equipo de investigación del departamento de Química Analítica de la Facultad de CC. Químicas de la UCM. Detalles de este trabajo conjunto pueden encontrarse en la referencia 142.

emplearon membranas (Millipore) de 0,45  $\mu\text{m}$ , para lo que se empleó una bomba de vacío Barna.

La separación cromatográfica se llevó a cabo haciendo uso de un gradiente lineal como fase móvil con metanol-ácido acético-agua (10:2:88 v/v/v) como solvente A y metanol-ácido acético-agua (90:2:8) como solvente B<sup>193</sup> a una velocidad de flujo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>según se muestra en la tabla 3.2.

<b>t ( min)</b>	<b>A ( %)</b>	<b>B ( %)</b>
0	85	15
5	65	35
8	65	35
15	50	50
25	30	70

Tabla 3.2. *Gradiente lineal empleado en la separación de trans-resveratrol en hoja de vid.*

Para la detección fluorimétrica de la molécula de trans-resveratrol se emplearon  $\lambda_{\text{ex}}$  de 330 nm y  $\lambda_{\text{em}}$  de 374 nm<sup>193,194</sup>. Los picos cromatográficos se identificaron por comparación de los tiempos de retención de las muestras con los de los compuestos puros. Una vez encontrado el programa de gradiente lineal óptimo para la molécula de trans-resveratrol se pudo proceder a la elución de la muestra directamente sin que hubiese solapamiento con otros compuestos de la muestra incluido su isómero cis-resveratrol. El tiempo de retención para el trans-resveratrol es de  $11,09 \pm 0,08$  min tal y como se muestra en la figura 3.12.

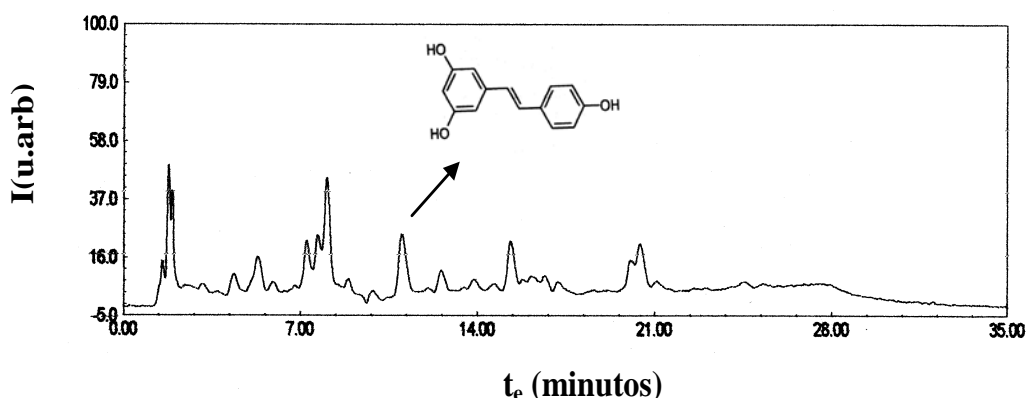


Fig 3.12. Cromatograma de hoja de vid obtenido por detección fluorométrica  $\lambda_{ex}$  de 330 nm y  $\lambda_{em}$  de 374 nm.

Los picos cromatográficos se identificaron por comparación de los tiempos de retención de cada uno de los picos de la muestra con el tiempo característico correspondiente al del compuesto estándar.

La cuantificación por la técnica de HPLC del trans-resveratrol en los extractos etanólicos obtenidos a partir de la hoja de vid se realizó en primer lugar mediante el método de adiciones estándar, en el que cantidades conocidas de trans-resveratrol son añadidas a un volumen también conocido de muestra, de modo que el corte con el eje de abscisas de la recta de ajuste a los puntos del área obtenida para cada una de las muestras en función de la concentración de trans-resveratrol añadida proporciona la cantidad de trans-resveratrol presente en la muestra. Para ello se utilizaron cuatro disoluciones preparadas a partir de 1 mL de la muestra de extracto etanólico al que se le añadieron 1 mL de etanol con diferentes cantidades de trans-resveratrol que variaban de 1,5 a 15  $\mu\text{g}$  y 2 mL de disolución de agua-ácido acético a pH 2,6. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.13.

Cada muestra se inyectó cuatro veces en el sistema cromatográfico de modo que resultó una concentración media del contenido de trans-resveratrol en la hoja de vid resultando un valor de  $3,1 \pm 0,1 \text{ mgL}^{-1}$  dado que se trabajó con un factor de dilución de 1:3.

Con el fin de descartar posibles efectos de matriz, se realizó igualmente una calibración externa para lo que se utilizaron cuatro muestras de trans-resveratrol (entre 0,5 y 5

mg·L<sup>-1</sup>) preparadas utilizando el mismo volumen de muestra y la misma disolución de agua-ácido acético (pH 2,6). Cada muestra se inyectó 4 veces en el cromatógrafo. Los resultados, mostrados igualmente en la figura 3.13, permiten comprobar la ausencia de efectos de matriz, como se puede deducir por el paralelismo entre la recta de adiciones estándar y la de calibración externa. Por otra parte, si se utiliza esta recta para determinar el contenido en trans-resveratrol de la muestra de este extracto etanólico se obtiene un valor de  $3,2 \pm 0,1$  mg·L<sup>-1</sup> que es consistente con el obtenido anteriormente mediante la técnica de adiciones estándar.

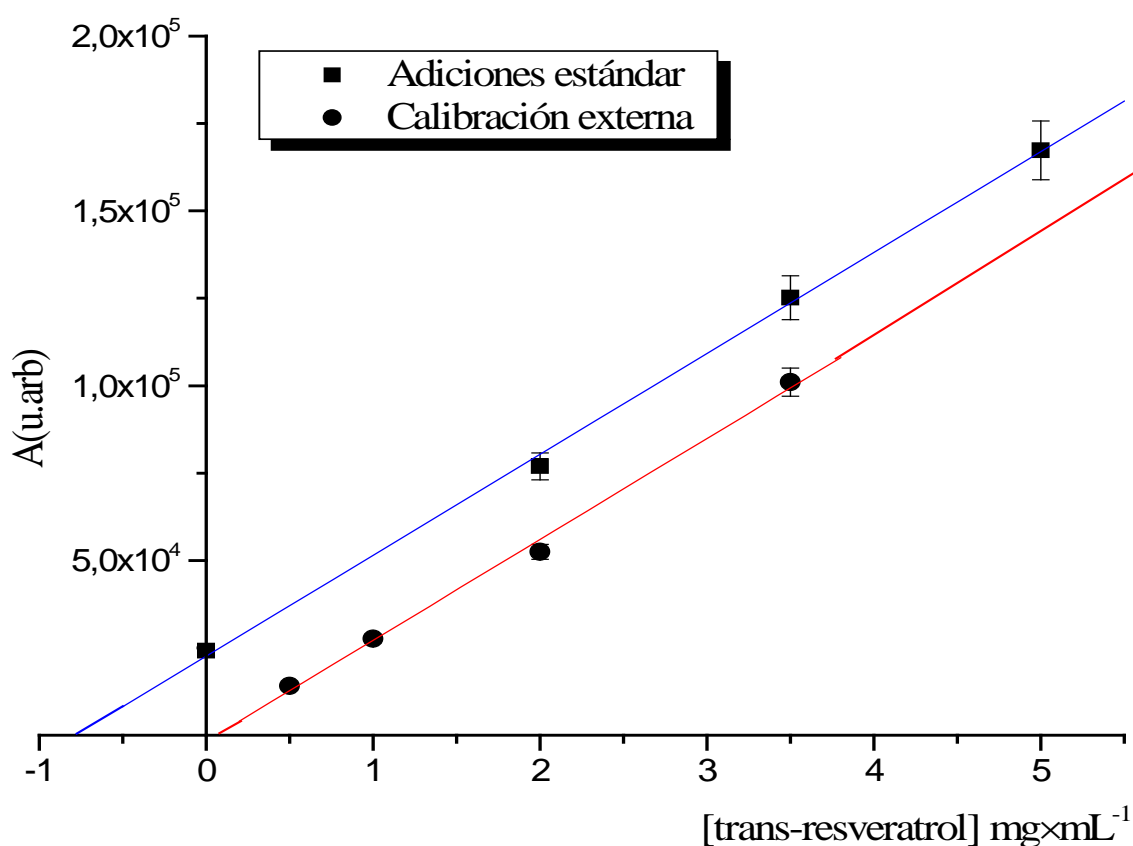


Figura 3.13. Rectas de calibrado por adiciones estándar en la muestra y calibrado externo en el rango de 0,5 a 5 mgL<sup>-1</sup> haciendo uso de RP-HPLC.

Con el fin de evaluar la precisión del método cromatográfico, se repitió el análisis en el mismo día y también en distintos días y con distintos operadores para una concentración de trans-resveratrol de 1,5 mg·L<sup>-1</sup> (n = 4). Los parámetros analíticos obtenidos se recogen en la tabla 3.3.

Parámetro Analítico	RP-HPLC
Linealidad ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0-15
Reproducibilidad (%)	4
Límite de detección ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	20
Límite de cuantificación ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	67

Tabla 3.3. Principales parámetros analíticos en el análisis de *trans*- resveratrol en extractos de hoja de vid.

En el caso del análisis de la muestra por la técnica LD-REMPI-TOFMS, la cantidad de muestra que se deposita sobre el disco pyrex es de 0,5 mL de extracto con 30 mg de cinc. El análisis se realizó utilizando los parámetros experimentales ya mencionados anteriormente. Un espectro de masas en las condiciones óptimas de desorción para la matriz de la hoja se puede ver en la la figura 3.14.

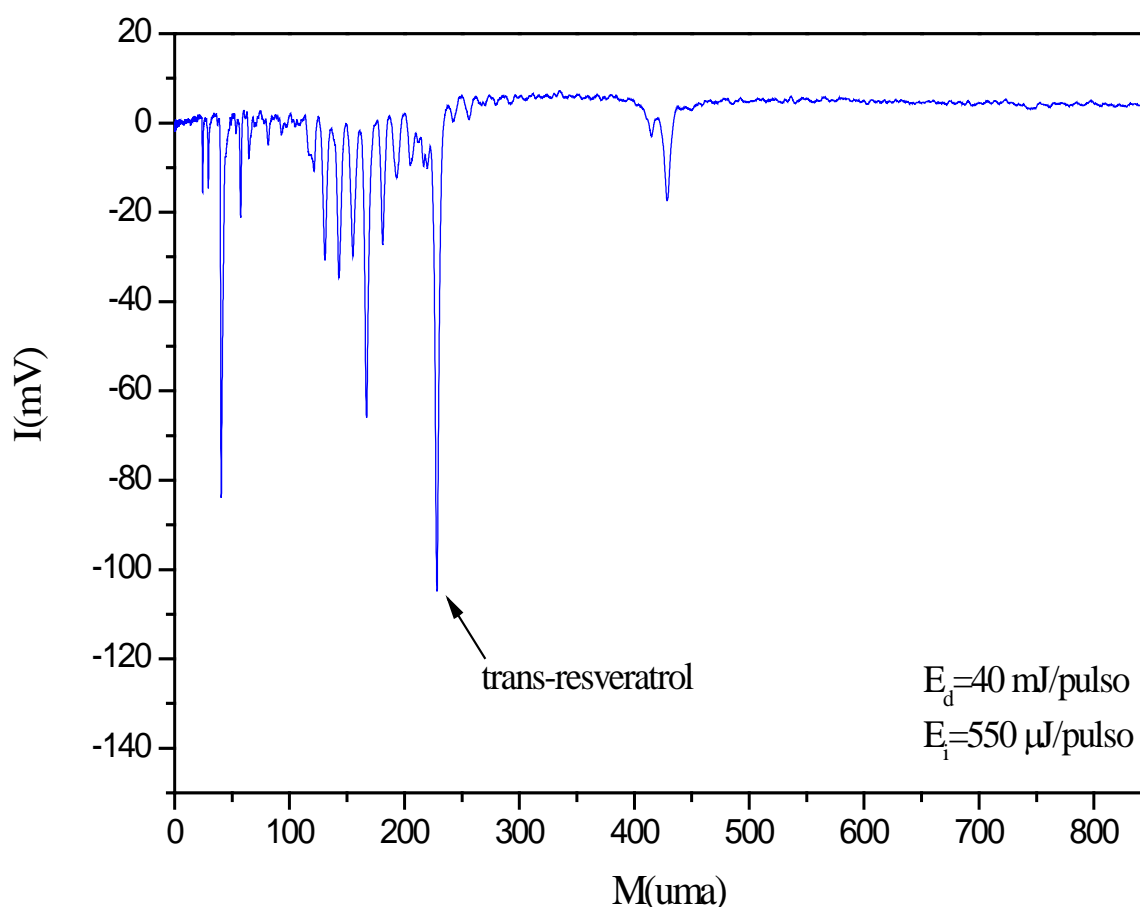


Figura 3.14. Espectro de masas de una muestra de hoja de la variedad Aledo.

El contenido de trans-resveratrol en este tipo de muestras se determinó haciendo uso del método de adiciones estándar. La recta de ajuste a los puntos experimentales se muestra en la gráfica de la figura 3.15.

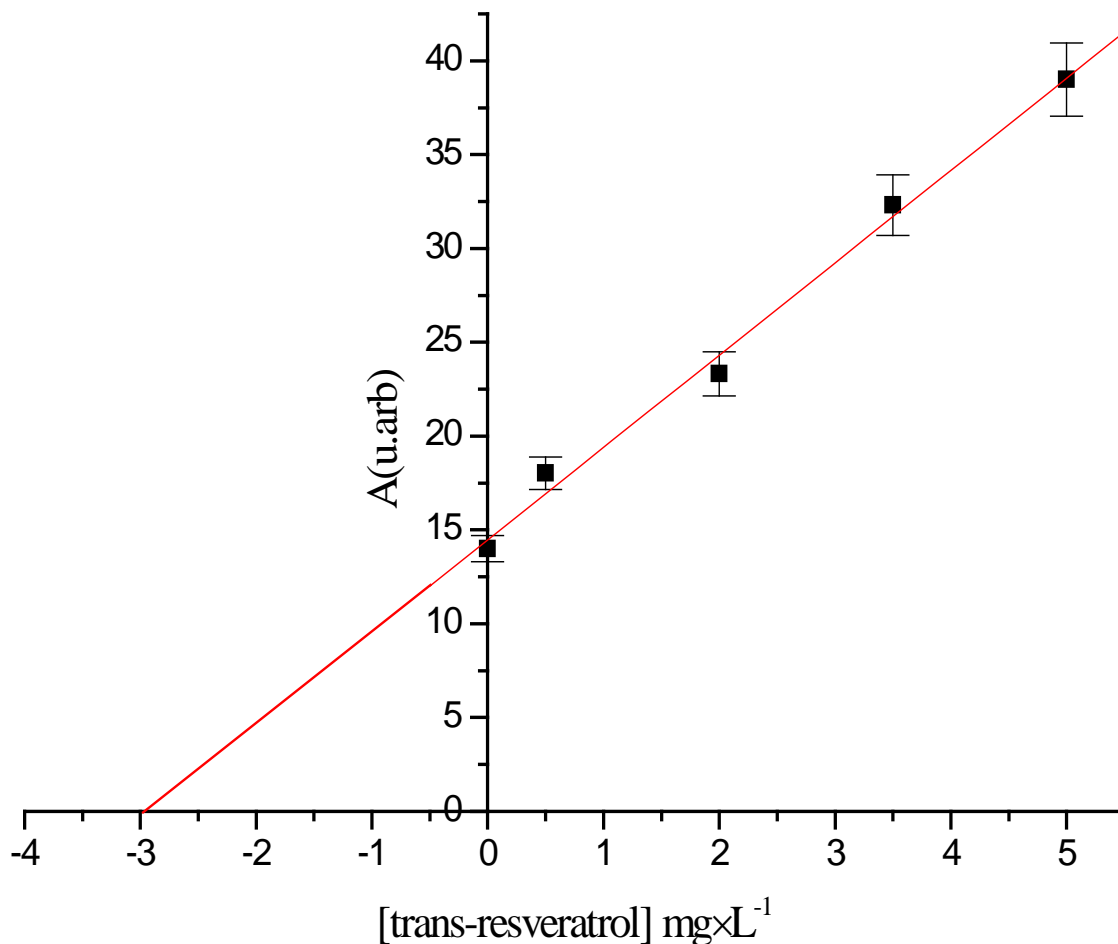


Figura 3.15. Calibración por el método de adiciones estándar desde 0,5 a 5  $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$  por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS.

A partir de la recta representada en la figura 3.15, se obtiene un valor para la concentración de trans-resveratrol en las hojas de vid de la variedad Aledo de  $3,0 \pm 0,2 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ .

De la comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas, se han calculado una serie de parámetros analíticos que permiten una comparación entre las dos técnicas. Los resultados de dicha comparación se muestran en la tabla 3.4.

Parámetro Analítico	RP-HPLC	LD-REMPI-TOFMS
Linealidad (mg L <sup>-1</sup> )	0-15	0-20
Reproducibilidad (%)	4	4,4
Límite de detección (µg L <sup>-1</sup> )	20	2,1
Límite de cuantificación (µg L <sup>-1</sup> )	67	6,3
Tiempo necesario para una medida (min)	30	45
Media e Intervalo de confianza (mg L <sup>-1</sup> )	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,2

Tabla 3.4. Comparación de los principales parámetros analíticos en el análisis de trans-resveratrol en extractos de hoja de vid para las técnicas RP-HPLC y LD-REMPI-TOFMS.

### 3.3.3. MÉTODOS DE AUMENTO DEL CONTENIDO ENDÓGENO DE *trans*-RESVERATROL EN UVAS.

Como se indicó en la introducción, existe un gran interés científico en el trans-resveratrol debido tanto a sus propiedades como molécula de defensa de las plantas como por los efectos beneficiosos para la salud humana derivados de su consumo. Esto ha hecho que surja un gran interés por estudiar métodos para favorecer su inducción en uvas después de la cosecha siendo la irradiación ultravioleta el más utilizado<sup>159-161</sup>. Posteriormente, estos resultados han permitido igualmente la obtención de vinos enriquecidos en trans-resveratrol<sup>162</sup>.

Se ha desarrollado un método de mejora en el contenido endógeno de trans-resveratrol en uvas de mesa y vino por medio de tratamientos anóxicos cortos en atmósfera controlada de nitrógeno. Para ello, se ha evaluado el efecto de diversos tratamientos anóxicos como método de inducción de estrés en la uva para aumentar la síntesis de trans-resveratrol en uvas de mesa. El resultado que se desprende de la aplicación de los tratamientos anóxicos cortos ha llevado a su aplicación en la elaboración de vino tinto de mesa como método de mejora de la calidad del vino.



Igualmente, se estudió el efecto del almacenamiento a baja temperatura y en atmósfera con elevada concentración de CO<sub>2</sub> sobre el contenido endógeno de trans-resveratrol en uvas. Este efecto ha sido correlacionado con la expresión del gen de la trans-estilbenosintasa (STS) observada a raíz de dicho tratamiento.

Por último, la aplicación de extractos naturales obtenidos a partir de hoja de vid ha mostrado dar unos resultados muy beneficiosos para la conservación de la uva después de su recolección, como se verá en la última parte de este apartado.

### 3.3.3.1. EXPERIMENTOS DE ANOXIA.

#### 3.3.3.1.1. UVA.

Se establecieron unos periodos de anoxia durante los que los racimos de uva comprados, variedad Aledo, se tuvieron en la cámara habilitada para tal fin como se muestra en la figura 2.10. Se utilizó una ligera sobrepresión de N<sub>2</sub> seco, 1,1-1,2 bares, para asegurar que prácticamente todo el O<sub>2</sub> es desplazado de la cámara y por razones de facilidad experimental ya que es más fácil mantener una sobrepresión de N<sub>2</sub> en la cámara que asegurar la estanqueidad de un sistema bajo vacío. Los distintos periodos anóxicos tenían una duración que oscilaba entre las 6 y las 48 horas. El hecho de circunscribir los tratamientos a una duración inferior a 48 horas es debido a que se ha demostrado que tratamientos de mayor duración pueden producir variaciones en las propiedades organolépticas de los frutos<sup>195</sup>.

Una vez terminado el tratamiento anóxico, cada racimo se sacó de la cámara con el fin de medir su contenido en trans-resveratrol para lo que, la uva se peló y seguidamente la piel se prensó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.1 y se midió el contenido en el mismo por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS. Como blanco se utilizó una muestra de uva de la misma remesa que no fue sometida a ningún tratamiento.

El contenido de trans-resveratrol después de los distintos periodos de anoxia se puede observar en la figura 3.16, en donde se muestra el contenido medido inmediatamente después de cada tratamiento en función del tiempo de duración del tratamiento.

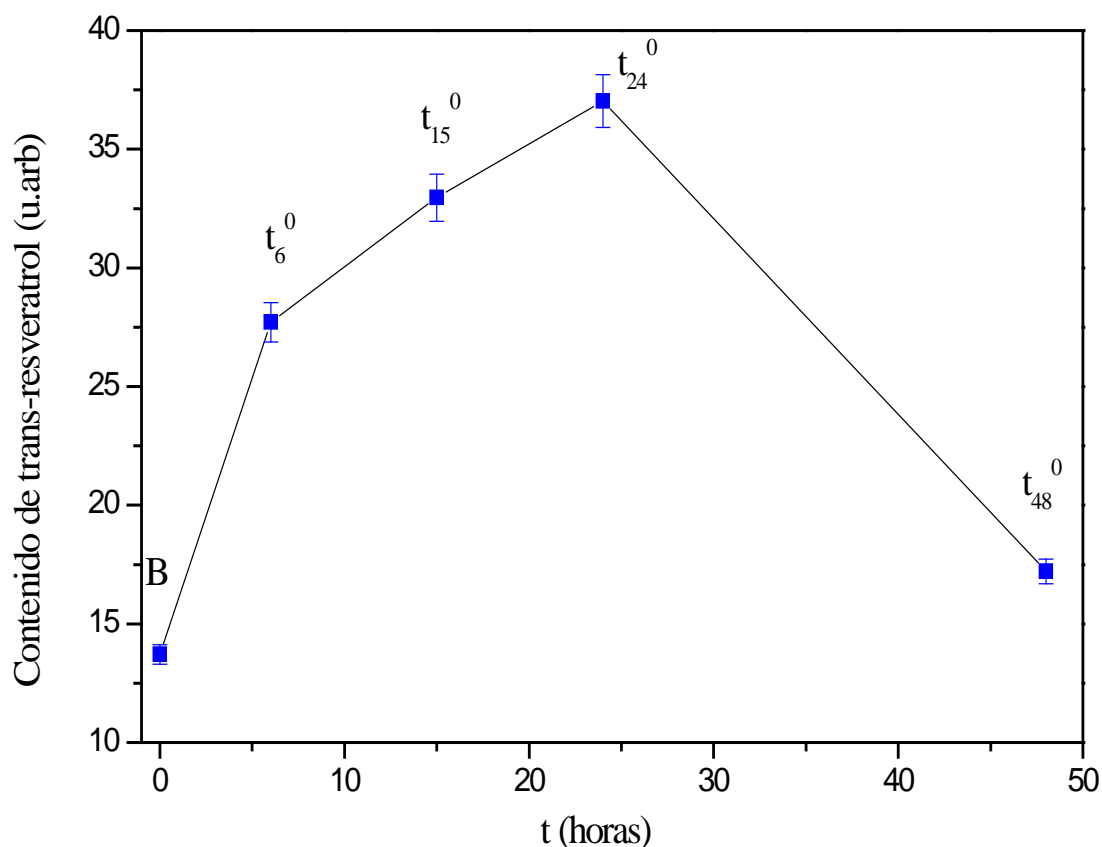


Figura 3.16. *Contenido de trans-resveratrol en piel de uva tras los diferentes tratamientos anóxicos.*

El subíndice indica el tiempo que la muestra estuvo bajo condiciones anóxicas. Como se puede observar, en las uvas sometidas a periodos de anoxia de hasta 24 horas se produce un aumento en el contenido de trans-resveratrol como respuesta al estrés; el incremento neto en el contenido de trans-resveratrol en las uvas por el tratamiento anóxico aumenta con la duración del tratamiento, siendo máximo para la muestra sometida a un tratamiento anóxico de 24 horas, con el que se llega a triplicar el contenido endógeno de trans-resveratrol en la piel de la uva antes del tratamiento. En tratamientos superiores a 24 horas, el aumento del contenido endógeno de trans-resveratrol disminuye de forma importante.

Uno de los parámetros indicativos del estado de salud de la fruta es el daño anóxico que se desprende tanto de forma visual, por observación del estado de madurez de la fruta, como midiendo sus propiedades organolépticas. En este sentido, es importante señalar que no se apreció un daño anóxico significativo en las uvas para tratamientos inferiores a 15 horas, para los cuales la calidad organoléptica de la uva no variaba con respecto al blanco. No

obstante, para tratamientos más largos la fruta aparece dañada de alguna manera de modo que se cuantifica un daño de un 3% y 10% para tratamientos de 24 y 48 horas respectivamente.

Una vez analizada la inducción de trans-resveratrol en las uvas para los distintos tiempos de tratamiento anóxico, se estudió la evolución del contenido de trans-resveratrol en los días posteriores al tratamiento, con el fin de estudiar la dinámica del proceso. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la figura 3.17.

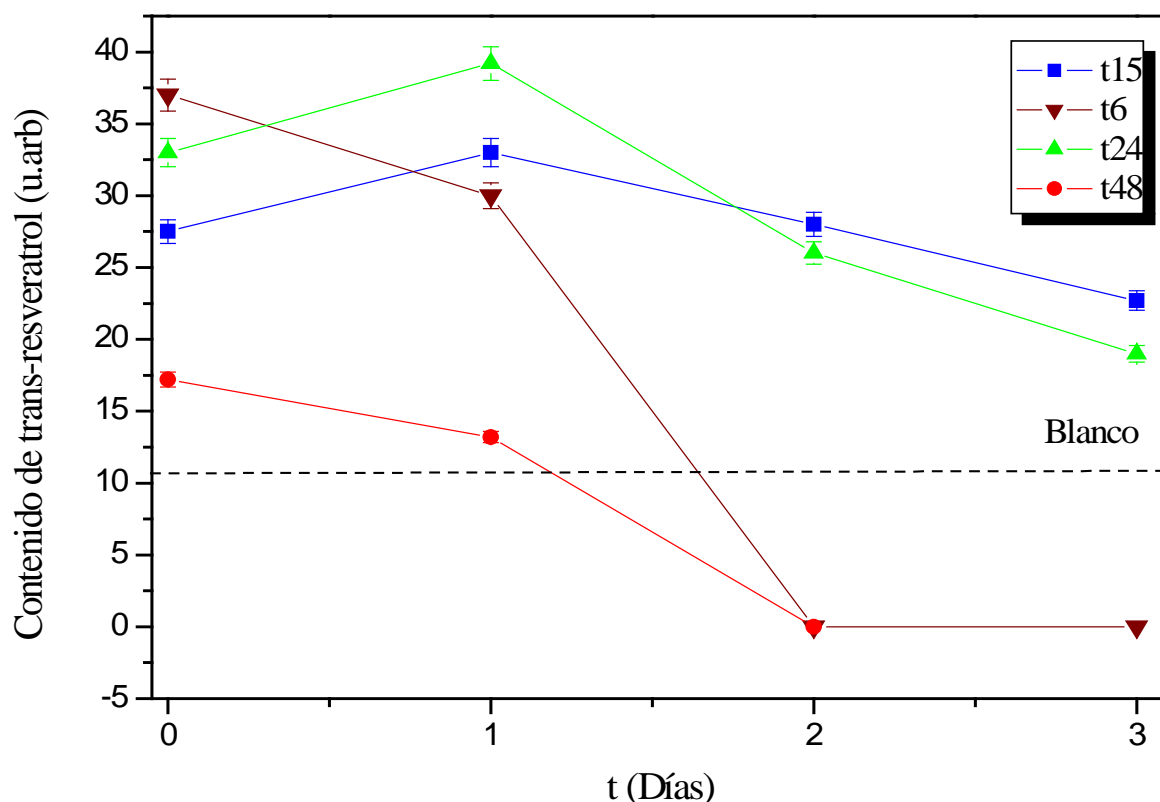


Fig 3.17. Evolución del contenido de trans-resveratrol en los días posteriores al tratamiento anóxico.

El contenido (inducido) de trans-resveratrol disminuye a lo largo del tiempo, sin embargo se encuentran de nuevo diferencias significativas entre los distintos tratamientos en función del tiempo de anoxia.

En las muestras sometidas a los tratamientos de 6 y 48 horas respectivamente, esta disminución es muy rápida, observándose que dos días después del tratamiento, el contenido en trans-resveratrol de estas uvas no es detectable. Sin embargo para los períodos de anoxia

de 15 y 24 horas respectivamente, el decrecimiento es mucho más suave, estando 3 días después del tratamiento aún por encima del grupo de control (línea punteada). De todos ellos parece que un tratamiento a 24 horas en condiciones anóxicas proporciona el mayor contenido en trans-resveratrol un día después de la aplicación.

### 3.3.3.1.2. VINO.

En los últimos años, el vino ha sido ampliamente estudiado debido a los beneficios que presenta para la salud, principalmente en lo que respecta a la prevención de enfermedades cardiovasculares y la reducción del riesgo de carcinogénesis. Dichas propiedades se atribuyen principalmente a su elevado contenido en compuestos fenólicos y, muy especialmente, al trans-resveratrol que presenta múltiples propiedades beneficiosas para la salud según se ha comentando anteriormente.

Como ya se indicó en la introducción, en las uvas el trans-resveratrol se acumula fundamentalmente en la piel y en las semillas y se ha encontrado tanto en uvas rojas como blancas en un amplio intervalo de concentraciones dependiendo de la variedad de la uva, factores ambientales presentes en la cosecha<sup>146,147</sup> etc. Es más, el trans-resveratrol se ha encontrado en vinos con un mayor contenido en vinos tintos que en vinos blancos o rosados, esta diferencia es debida, a que el mosto está en contacto con el hollejo en la fermentación que tiene lugar durante el proceso de vinificación, no obstante el contenido de trans-resveratrol en vinos es muy dependiente de las diferentes prácticas enológicas<sup>148-153</sup>.

Los resultados obtenidos en la inducción del contenido de trans-resveratrol en uvas mediante tratamientos anóxicos, han permitido desarrollar un método de obtención de vinos con mayor contenido en dicho compuesto sometiendo a las uvas a un tratamiento similar antes de la vinificación, este método ha sido patentado por nuestro grupo investigador de la Unidad de Láseres y Haces Moleculares del Instituto Pluridisciplinar conjunto con bodegas Valsardo. Las bodegas Valsardo<sup>a</sup> se encargaron de suministrar las muestras de vino correspondientes al blanco y al tratado elaborados con uvas de la variedad tempranillo y siguiendo los protocolos

---

<sup>a</sup> Se agradece a D<sup>a</sup> Paloma Escribano Presidente de Bodegas Valsardo de Peñafiel (Valladolid) el suministro de las muestras de vino sin tratar y tratado de acuerdo al protocolo desarrollado por nuestro grupo de investigación.

establecidos por nuestro grupo de investigación a partir de los resultados de anoxia descritos anteriormente.

Para la elaboración del vino se seleccionaron los racimos de la vendimia que presentaban uvas con el hollejo más turgente con el fin de evitar que mosteen durante el pretratamiento con nitrógeno. Las uvas se cargaron en un depósito estanco del que se evacúa el aire, introduciendo posteriormente nitrógeno seco a una presión ligeramente superior a la atmosférica. Las uvas deben permanecer en el citado depósito en atmósfera anóxica por un periodo no superior a 24 horas, controlando que durante dicho tiempo se mantenga la sobrepresión de nitrógeno en el interior de la cámara, para no dañar la calidad de las uvas. En el modo de elaboración del vino tratado, las uvas permanecieron durante un periodo de 24 horas. Como se vio previamente para el caso de las uvas con los tratamientos de 15 y 24 horas son bastante similares, por lo que se podría haber elegido también el primer tratamiento para la obtención del vino enriquecido. La razón para elegir el tratamiento de 24 horas fue la de maximizar la inducción de trans-resveratrol, ya que el deterioro subsiguiente observado se puede evitar elaborando el vino inmediatamente después del tratamiento. Por otra parte el 3% de daño anóxico observado con el tratamiento de 24 horas no es importante ya que en cualquier caso las uvas deben ser prensadas para elaborar el vino.

Inmediatamente después del tratamiento, se sacaron los racimos de la tina, previo venteo del sistema, y se separaron las uvas de los tallos mediante máquinas diseñadas para tal efecto, procediéndose al procesado habitual de la uva para su vinificación en el tinto. El despalillado y estrujado se inició inmediatamente después del tratamiento y a continuación se bombeó la pasta resultante al depósito de fermentación. Tras esperar 48 horas se realiza la siembra de levaduras, lo que originó el inicio de la fermentación alcohólica. Se estableció un programa diario de remontados con el fin de extraer el mayor contenido de compuestos polifenólicos de los hollejos de las uvas, consistiendo en un bazuqueo a primera hora de la mañana junto con un remontado de 15 minutos de duración. Concluida la fermentación alcohólica se procedió al descubado y prensado de los orujos, juntando el vino de sangrado con el vino prensa y dejando el depósito convenientemente cerrado para que realice la fermentación maloláctica de manera espontánea.

El efecto del tratamiento anóxico en la calidad del vino fue estudiado mediante diversos análisis comparativos del vino elaborado a partir de uvas tratadas y del vino de

control que se elaboró con uvas de la misma vendimia y con el mismo proceso de vinificación, pero sin ningún tratamiento anóxico.

Es importante destacar que no se han apreciado diferencias significativas en cuanto a las principales propiedades físico-químicas y organolépticas entre ambos vinos, teniendo en cuenta el análisis de los parámetros enológicos estudiados, principalmente: densidad, pH, acidez, graduación alcohólica, color, SO<sub>2</sub>, antocianos, etc. En la tabla 3.5 se muestran los parámetros comparativos de análisis para los dos vinos.

<b>Parámetro</b>	<b>Vino Experimental</b>	<b>Vino de Control</b>
Densidad	994,5	994,5
pH	3,61	3,88
Acidez total (TH2, g/L)	4,61	3,75
Volatilidad ácida (ac. acético, g/L)	0,29	0,40
Grado alcohólico (% v/v)	12,4	12,7
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	13	27
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	17	36
IPT (Folin Ciocalteau)	38	45
A <sub>420</sub>	2,43	3,03
A <sub>520</sub>	4,01	4,33
A <sub>620</sub>	0,97	1,26
T <sub>445</sub>	0,316	0,0676
T <sub>495</sub>	0,00603	0,0195
T <sub>550</sub>	0,0141	0,0060
T <sub>625</sub>	14,45	8,32
Intensidad de color	7,41	8,62
Antocianos (mg/L)	452	578

Tabla 3.5. *Parámetros enológicos en el vino obtenido de las uvas tratadas (vino experimental) y el vino de control. El análisis fue llevado a cabo un mes después de la fermentación maloláctica.*

El vino así obtenido fue el que se midió con la técnica LD-REMPI-TOFMS, para lo cual se empleó una cantidad de 0,5 mL de dicho vino que se depositó sobre el disco pyrex utilizando para ello una corriente de nitrógeno seco según se explico en el apartado 2.1.

Las condiciones óptimas para esta matriz fueron de 45 mJ/pulso de radiación infrarroja empleada para la desorción y de 450  $\mu$ J/pulso para la radiación ionizante. Los resultados comparativos se pueden observar en la gráfica de la figura 3.18 en donde se puede apreciar un aumento de aproximadamente unas seis veces superior en la cantidad de señal de trans-resveratrol para el vino obtenido de las uvas con pre-tratamiento de anoxia.

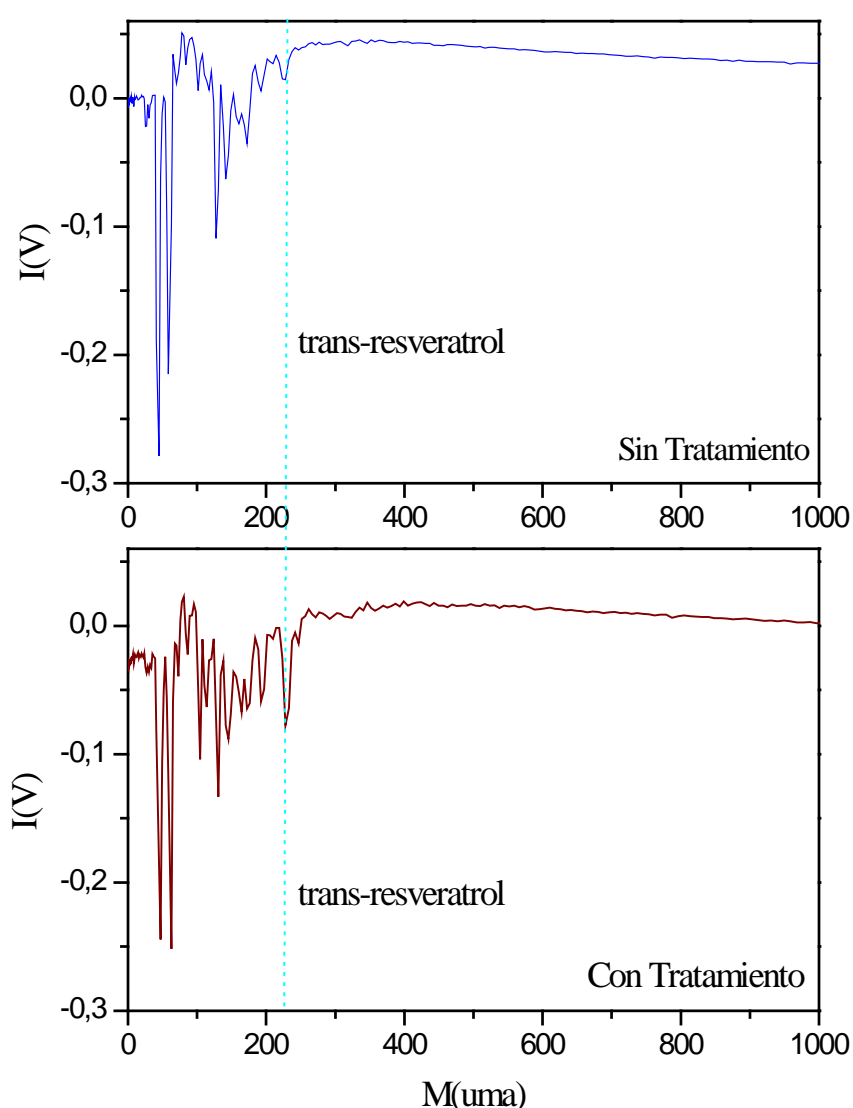


Figura 3.18. Espectros de tiempo de vuelo obtenidos a partir de dos muestras de vino. Superior: vino elaborado con uvas no tratadas. Inferior: vino elaborado con uvas sometidas a tratamiento anóxico.

### 3.3.3.2. TRATAMIENTOS A BAJA TEMPERATURA EN ATMÓSFERA CONTROLADA.

El almacenamiento a baja temperatura es una de las tecnologías más empleadas y eficaces para prolongar la durabilidad de las frutas y vegetales después de la cosecha. En concreto, el tiempo de almacenamiento a baja temperatura para uvas de mesa está limitado por su elevada sensibilidad al ataque fúngico, concretamente a la *Botrytis Cinerea* capaz de infectar a bajas temperaturas. Este patógeno que tiene un fuerte impacto económico en horticultura está usualmente controlado mediante fungicidas pero sigue siendo una de las principales causas de putrefacción en productos vegetales (incluyendo las uvas) después de la cosecha<sup>170</sup>. Más aún, debido a que los tratamientos químicos después de la cosecha están restringidos en la mayoría de los países se hace necesario el desarrollo de tecnologías alternativas. Se han utilizado alternativas como el empleo de SO<sub>2</sub> durante cortos periodos de forma aislada o combinado con el empleo de fungicidas naturales<sup>196</sup>, también se ha hecho uso de una atmósfera controlada bajo un flujo continuo con el fin de aumentar el periodo de vida de la uva de mesa en almacenamiento en frío<sup>171</sup>. No obstante, se han visto limitaciones para tiempos prolongados de almacenamiento bajo atmósferas controladas<sup>172</sup>.

Una alternativa a los métodos anteriores, en el caso concreto de la uva de mesa puede ser el pretratamiento con elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> durante cortos periodos de almacenamiento, teniendo en cuenta el bajo riesgo que supone el empleo de este gas como medio de preservación. Para ello, se debe conocer la eficacia de un tratamiento de este tipo observando su correlación con la activación de mecanismos de defensa en la uva. Con el fin de comprender la mejora que supone en el almacenamiento a baja temperatura la aplicación de una atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> se ha analizado la eficacia de un pretratamiento con 20% de CO<sub>2</sub> en uvas después de la cosecha y correlacionándola con el contenido en trans-resveratrol y la expresión de la STS durante el almacenamiento a 0°C. Posteriormente se ha medido su evolución durante dos días a la temperatura ambiente de 20°C.

Las uvas de la variedad *Cardinal* procedentes de Camas (Sevilla) se transportaron al Instituto del Frío<sup>a</sup> donde se mantuvieron durante 14 horas a -1°C. Transcurrido este periodo,

---

<sup>a</sup> Los resultados obtenidos referentes al análisis de la evolución del gen de la estilbeno-sintasa proceden de un estudio llevado a cabo por la



se seleccionaron las uvas libres de defectos físicos y patológicos y se hicieron dos lotes que se almacenaron a 0°C y 95% de humedad relativa en dos contenedores sellados de neopreno de 1 m<sup>3</sup> de capacidad. Cada contenedor contenía 10 bolsas de plástico con 3 Kg de uva cada una. Uno de los lotes se almacenó bajo condiciones atmosféricas normales durante 33 días (uva no tratada) y el otro se introdujo durante 3 días en una atmósfera con 20% CO<sub>2</sub> + 20% O<sub>2</sub> + 60% N<sub>2</sub> (uva tratada). La concentración de CO<sub>2</sub> se mantuvo constante durante el pretratamiento y se midió diariamente haciendo uso para ello de un sistema cromatográfico de gases equipado con un detector de conductividad térmica y una columna Poraplot Q (Varian Chrompack CP20033P ).

Transcurridos tres días, las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> fueron transferidas a las mismas condiciones en que se encontraban las uvas no tratadas hasta el fin del experimento. Al concluir el período de 33 días de almacenamiento a baja temperatura, tanto las tratadas como las no tratadas se almacenaron en un contenedor ventilado durante 2 días a 20°C y un 95% de humedad relativa con el fin de simular condiciones habituales de mercado.

Durante el transcurso del experimento, se tomaron varias muestras de uva de ambos grupos. Estas uvas se pelaron y la piel se introdujo en nitrógeno líquido hasta convertirse en polvo fino que se almacenó a -80°C hasta el análisis.

En la tabla 3.6 se muestran una serie de parámetros comparativos para diferentes muestras, con el fin de tener una estimación de los parámetros de calidad en las mismas.

---

profesora Carmen Merodio y a su grupo investigador del Dpto de Ciencia y Tecnología de los Productos Vegetales del Instituto del Frío del CSIC para las muestras que nos proporcionaban. Detalles de este trabajo conjunto se pueden encontrar ver [ref 174].

Parámetros de calidad	Después de la cosecha	Después de tres días de almacenamiento a 0°C	
		Aire	Tratadas con CO <sub>2</sub>
Índice de Marchitamiento <sup>x</sup>	0,00 a <sup>z</sup>	3,33 b	1,50 a
Índice de Oscurecimiento <sup>y</sup>	0,00 a	2,83 b	1,67 ab
Contenido relativo de agua (%)	88,78 a	56,52 b	76,97 ab
Pérdida de peso(%)	0,00 a	7,42 b	3,93 c
Materia seca (%)	14,71 a	15,41 a	14,96 a
CSS (° Brix)	12,85 a	14,10 b	14,28 b
AT (% ácido tartárico)	0,843 a	0,697 b	0,775 c
Índice de madurez (SSC/TA)	15,24	20,23	18,43
pH	3,33 a	3,69 b	3,64 b
L*	35,95 a	24,56 b	23,22 b
a*	16,75 a	2,61 b	3,94 c
Índice cromático	16,89 a	2,84 b	4,07 c
Antocianos totales (mg/g FW)	1,40	1,86	1,57
Deterioro total	0,0 a	25,5 b	5,0 a

<sup>x</sup>Escala de marchitamiento: 0=nada; 1=inicio de marchitamiento en las partes más altas y bajas del racimo; 2=marchitamiento de la parte baja, parte alta del racimo 10% del tallo principal; 3=marchitamiento de 50% como máximo del tallo principal; 4=marchitamiento total del tallo principal

<sup>y</sup>Escala de oscurecimiento: 0=nada; 1=poco; 2=moderado; 3=severo; 4=extremo

<sup>z</sup>Medias en filas con diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (LSD = 99%)

Tabla 3.6 *Características físico-químicas de la variedad Cardinal tratada con 20% de CO<sub>2</sub> y almacenadas a 20 °C..*

Los racimos no tratados presentaron un gran aumento en el índice de marchitamiento al final del almacenamiento a baja temperatura y mayor que en las tratadas con CO<sub>2</sub>, análogamente en el caso del índice de oscurecimiento para el tallo se observó un aumento en las no tratadas con respecto a las tratadas indicando que el tratamiento con CO<sub>2</sub> es efectivo en el mantenimiento de la apariencia visual del tallo. Los beneficios del tratamiento con CO<sub>2</sub> en cuanto a apariencia se refiere, pudieran ser explicados como una menor pérdida de agua según se desprende de la tabla, esto es, los racimos tratados pierden menos peso que los no tratados.

En lo que respecta a la calidad de las uvas, se observó que al final del almacenamiento a baja temperatura el parámetro indicativo de materia seca para las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> no cambió con respecto a la uva cultivada mientras que en la uva no tratada se detectó un pequeño descenso. El tratamiento con CO<sub>2</sub> mantiene el brillo en el color de la piel mejor con un valor de  $c^*$  mayor que en las no tratadas. En cuanto a los antocianos, estos aumentan en los dos pero de manera más significativa en las no tratadas. En las tratadas con CO<sub>2</sub>, el deterioro fue menos pronunciado que en las no tratadas. De modo que transcurridos 33 días de almacenamiento a 0°C se cuantificó un 25,5% de deterioro total en uvas no tratadas frente sólo un 5% en las tratadas con CO<sub>2</sub>.

Con la técnica LD-REMPI-TOFMS se midió el contenido de trans-resveratrol tanto en las uvas tratadas como no tratadas según se aprecia en la figura 3.19 y para ello la piel de uva micropulverizada, mantenida a -80°C como se ha indicado anteriormente, se extrajo con metanol a temperatura ambiente, lo que permitió disponer de un extracto que pudo ser medido directamente por la técnica LD-REMPI-TOFMS. Para cada análisis se utilizó 1 mL de muestra y se realizaron 5 análisis para cada muestra promediando 400 espectros.

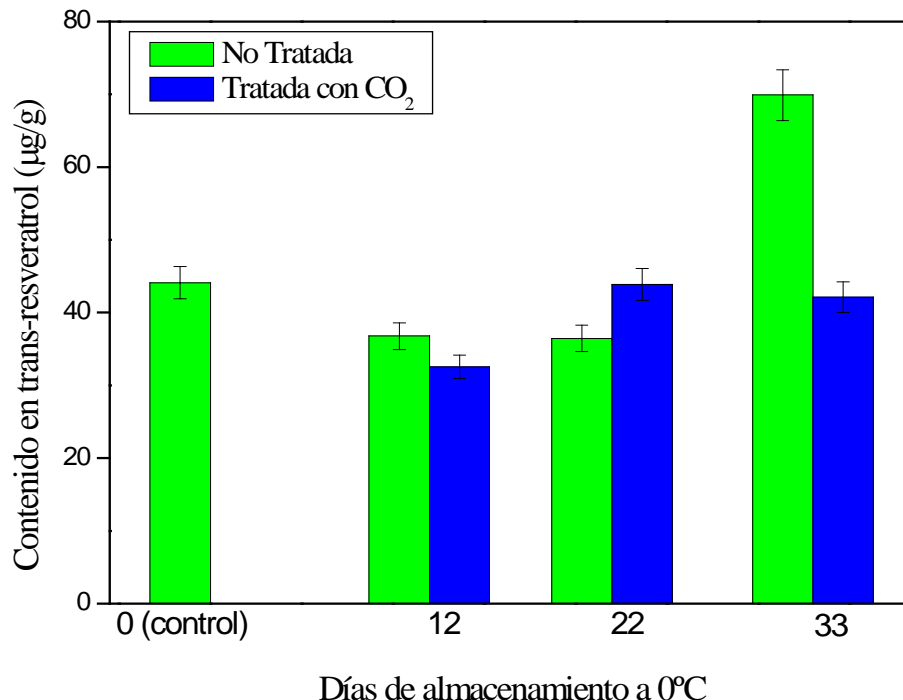


Figura 3.19. Evolución del contenido de trans-resveratrol en uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y sin tratar.

De la figura anterior se desprende que el contenido en trans-resveratrol para las uvas recién recogidas fue de 44,11  $\mu\text{g/g}$ , de modo que transcurridos 22 días de almacenamiento a 0°C, para las uvas tratadas con CO<sub>2</sub>, se observó un aumento en el contenido de trans-resveratrol. En cuanto a las uvas no tratadas, se observó una acumulación nítida en el contenido de trans-resveratrol después de 33 días de almacenamiento alcanzando los valores de 69,89  $\mu\text{g/g}$ , lo que representa que el contenido en trans-resveratrol para las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> fue de un 60% del de las no tratadas.

Con el fin de determinar si el almacenamiento a baja temperatura de las uvas puede afectar a la expresión del gen de la STS y como dicho tratamiento junto con la elevada concentración de CO<sub>2</sub> puede afectar a la acumulación del transcrito, se midió la cantidad de ARNm obtenida de las pieles tanto de las uvas tratadas como no tratadas. El análisis se realizó por hibridación de Northern<sup>197</sup> a partir de las diferentes muestras de piel de uva tomadas durante el almacenamiento a 0°C. Como prueba se utilizó un clon parcial del ADNc de 773 bp que se obtuvo por RT-PCR (N° de registro DQ235274), el resultado se muestra en la gráfica de la figura 3.20.

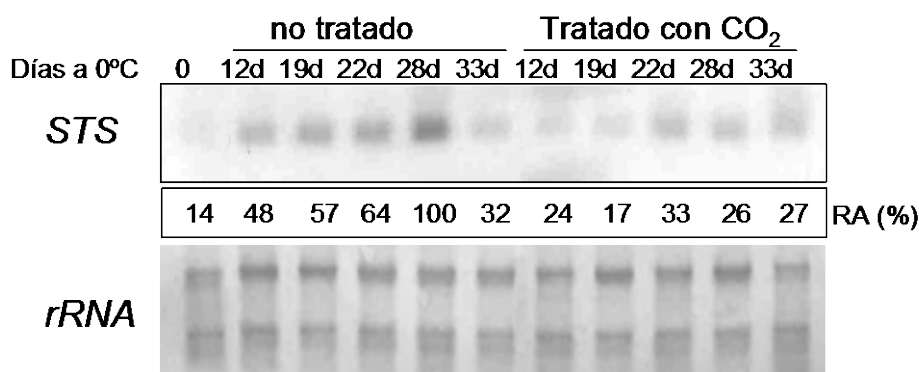


Figura 3.20. Seguimiento de la evolución de la transcripción del gen de la STS para las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y sin tratar.

El almacenamiento de las uvas a 0°C indujo una acumulación de ARNm del gen de la STS tanto en las uvas tratadas como no tratadas. No obstante, los niveles de ARNm en las uvas no tratadas resultaron mayores que en las tratadas con CO<sub>2</sub>. En las uvas no tratadas hubo una paulatina acumulación del transcriptor de la STS que alcanzó su máximo en el día 28 a

partir del cual disminuyó ligeramente. Sin embargo los niveles del transcripto de la STS las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> permanecieron estables hasta el fin del periodo de almacenamiento.

Tras el periodo de 33 días de conservación a 0°C y con el fin de simular las condiciones reales en el mercado, tanto las uvas tratadas como las no tratadas se llevaron a las condiciones de 20°C durante dos días durante los que se midieron tanto los cambios en la expresión del gen de la STS y el contenido de trans-resveratrol. Transcurridos los dos días en las condiciones citadas, se produjo un claro aumento en los niveles de ARNm de la STS tanto en las uvas tratadas como no tratadas, siendo un 35% mayor para las uvas no tratadas tal y como se puede apreciar en la figura 3.20, donde se muestran dichos valores junto con los del contenido de trans-resveratrol en la piel de las uvas para facilitar la comparación.

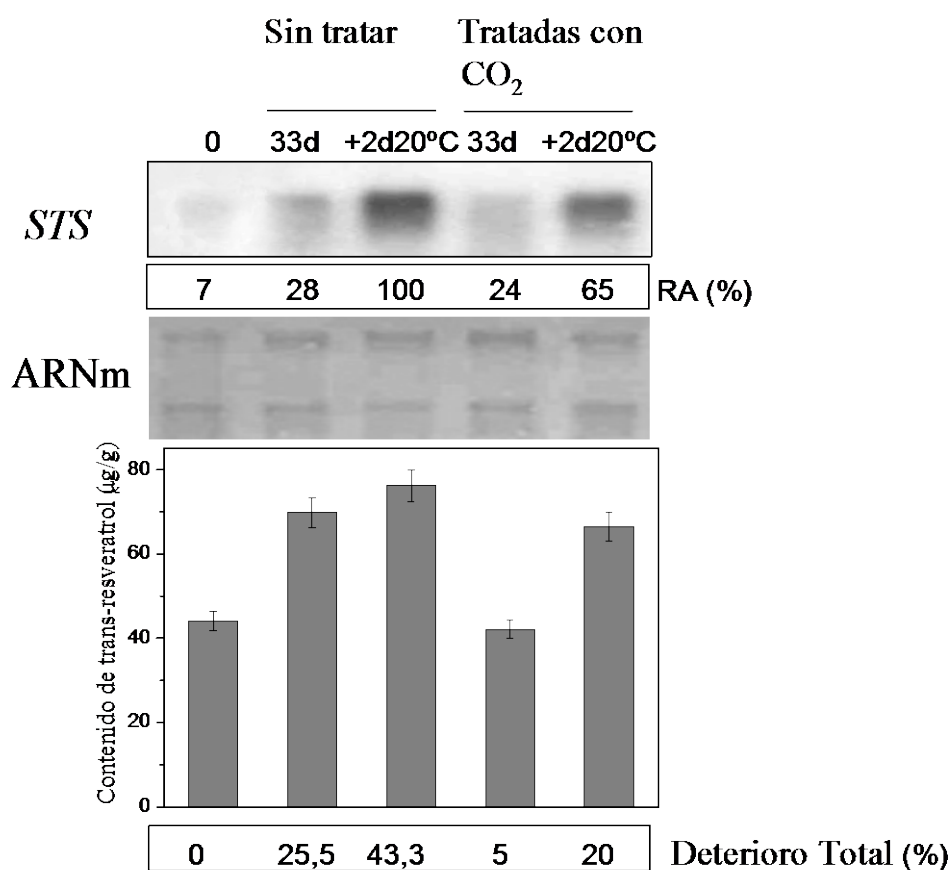


Figura 3.21. Evolución en los niveles de ARNm y trans-resveratrol así como porcentaje de marchitamiento total para las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y no tratadas una vez puestas en condiciones de almacenamiento normales de mercado.

Como se verá con más detalle en el apartado de Discusión, después de los dos días de almacenamiento a temperatura ambiente se obtienen niveles comparables en cuanto al contenido en trans-resveratrol en ambos grupos de uvas (tratadas y no tratadas), aunque el aumento es mucho mayor durante estos 2 días en las uvas tratadas que, como ya se ha indicado, mantuvieron durante el periodo de almacenamiento a 0°C niveles similares a los iniciales y menores que los de las uvas no tratadas.

En cuanto a la eficacia del método para la conservación de las uvas, se puede observar que el deterioro total es más del doble en las uvas no tratadas que el de las uvas tratadas.

### 3.3.3.3. ELICITACIÓN SELECTIVA DE trans-RESVERATROL EN LA PIEL DE LA UVA MEDIANTE IRRADIACIÓN UV.

Debido a las propiedades beneficiosas que presenta el consumo de trans-resveratrol, ha suscitado un enorme interés su síntesis en uvas a partir de su inducción por diferentes métodos, siendo la inducción por irradiación UV el más investigado tanto en hojas de vid como en uvas<sup>159,160,161,198,199,200</sup>. Igualmente se ha investigado el aumento en el contenido endógeno de trans-resveratrol en vino tanto mediante la irradiación de las uvas empleadas en la elaboración del vino<sup>163</sup> como por la irradiación directa del vino<sup>164</sup>. Estudios recientes demuestran que la irradiación con UV es más eficaz que los tratamientos con ozono para aumentar el contenido de trans-resveratrol en uvas mediante tratamientos cortos<sup>201</sup>.

Los resultados publicados muestran una gran variabilidad en el aumento en el contenido de trans-resveratrol alcanzado que oscila entre 1,5<sup>161</sup> a 50<sup>167</sup>. Este amplio intervalo puede deberse a: diferentes variedades y estado de madurez de la uva, diferentes tratamientos (longitud de onda de la luz, intensidad de la radiación, tiempo de irradiación, distancia de la fuente a las uvas, etc.), diferente tiempo y condiciones de almacenamiento entre la irradiación y el análisis, etc. Más aún, los métodos para analizar el contenido de trans-resveratrol en las uvas irradiadas son diferentes lo cual puede contribuir a la variabilidad observada en los resultados publicados según se ha demostrado<sup>165</sup>.

Por otra parte, se ha observado una buena correlación entre la producción de trans-resveratrol inducido por irradiación con UV-C y la resistencia a la *Botrytis Cinerea*<sup>166</sup>, así como

su resistencia al *Rhizopus stolonifer*<sup>167</sup> en diferentes tipos de uva de mesa. Además, se ha demostrado que la irradiación UV puede disminuir el deterioro post-cosecha en uvas de mesa<sup>168</sup>; aunque estos autores sólo estudiaron la evolución temporal de las uvas dañadas y no se llevaron a cabo ningún tipo de análisis químico, parece clara la correlación entre el aumento de la resistencia natural de las uvas observado y la elicitación del contenido en trans-resveratrol.

Según se indicó en la introducción de esta tesis, desde un punto de vista bioquímico, el trans-resveratrol se sintetiza en las uvas catalizado por la encima estilbeno sintasa (STS)<sup>94,160</sup>. Se han caracterizado diferentes genes de la STS y se han agrupado según su expresión como respuesta a estreses bióticos y abióticos<sup>202-204</sup>. Una clara demostración del papel de la STS surge con las diferentes investigaciones en la transferencia del gen STS de la vid a otras plantas, apuntando a un desarrollo de nuevas plantas que aumentan la resistencia frente a agentes patógenos y mejoran las propiedades nutricionales<sup>205,207</sup>. En este sentido, se ha demostrado que la irradiación UV elicita la expresión del ARN-m de la STS el cual, se correlaciona con la acumulación de trans-resveratrol en las hojas de vid<sup>208</sup> y uvas<sup>209</sup>.

En lo que respecta a la elección de la longitud de onda empleada para la irradiación, la mayoría de los trabajos previos publicados no especifican las razones de escoger una u otra longitud de onda. El empleo de un láser sintonizable para la irradiación permite el uso de fotones de energía resonante con el fin de promover la absorción a través de estados electrónicos reales de la molécula bajo estudio, y de esta forma introducir un parámetro molecular específico en el proceso de absorción lo que va a aumentar significativamente dicho proceso. Como ya se ha indicado en esta tesis la longitud de onda resonante para la molécula de trans-resveratrol es de 302,05 nm. En este trabajo investigamos el efecto de la elicitación de trans-resveratrol via irradiación con UV por el empleo de longitud de onda resonante para este compuesto en comparación con la irradiación con una longitud de onda próxima pero no resonante.

Para los experimentos se empleó uva roja de la variedad Red Globe adquirida directamente del mercado en su estado de maduración habitual para su comercialización, y no se realizó ningún tipo de tratamiento ni limpieza adicional. Con el fin de disminuir los efectos de diferente estado de madurez entre los distintos racimos, se cortó cada racimo en varias partes que se entremezclaron entre ellas resultando una distribución más homogénea de los grupos de ensayo. Las uvas a tratar se sacaron de los racimos dejando en todos los casos el pedúnculo, con el fin de minimizar los efectos de deshidratación en las mismas. La irradiación se llevó a cabo

disponiendo las uvas individuales sobre la corona externa de un disco de 30 cm de diámetro que puede rotar a una velocidad angular modulable en torno a su eje central a modo de carrusel, de este modo se distribuyeron 24 uvas de forma homogénea con una separación de  $15^\circ$  entre dos muestras consecutivas. Durante la irradiación, el disco giraba a una velocidad de  $6^\circ/\text{min}$  con el fin de obtener una irradiación uniforme en todas las muestras. Los tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La figura 3.22 muestra el sistema experimental empleado en la irradiación de las uvas.

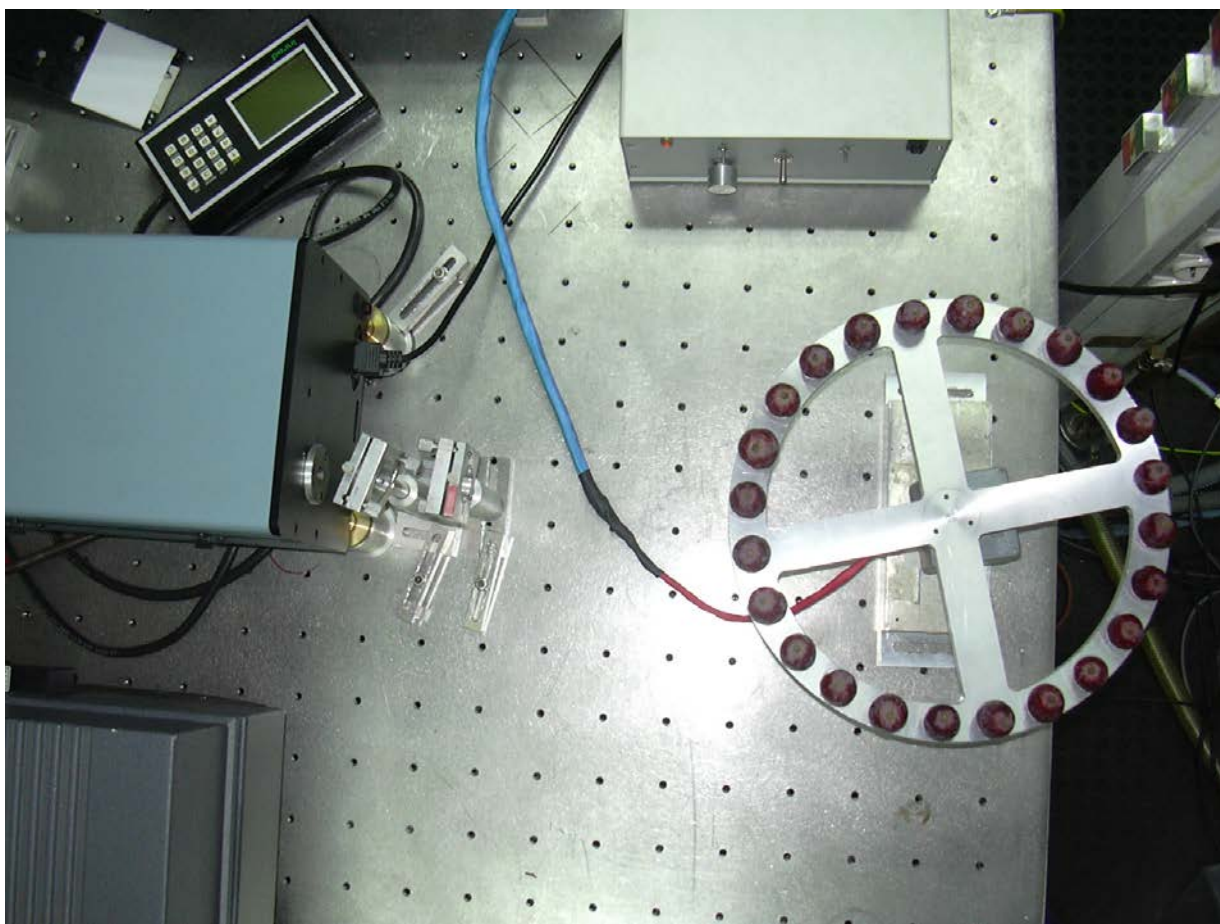


Figura 3.22. Vista en planta del sistema empleado en la irradiación de las uvas.

Para la irradiación, se empleó un láser de colorante doblado en frecuencia (Continuum ND60) con un sistema de salida (INRAD-AT-III-UV) con un cristal doblador (BBO-TST) permitiendo un barrido en longitudes de onda de 235 a 365 nm. El diámetro del haz láser fue de 6 mm que posteriormente se abrió a 15 mm por medio de una lente divergente de distancia focal -4 metros con el fin de disponer de una mayor superficie de irradiación en las uvas. La



fluencia de la radiación fue de  $0,141 \text{ kJ/m}^2$  con pulsos de 5 ns disparados a una frecuencia de 10 Hz.

Para la irradiación se emplearon dos longitudes de onda diferentes: 302,1 nm como longitud de onda resonante y 300 nm como longitud de onda no resonante. Se eligieron cuatro conjuntos de tiempos de exposición: 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente de modo que, tanto para el experimento resonante como no resonante, se cogieron 6 uvas que inmediatamente se pelaron. La piel obtenida se secó y se trituyó por medio de un molino (Ika-Analytical mill A 11 basic) proporcionando un tamaño de grano de una micra para posteriormente introducir cada muestra en viales a los que se les añadió 60 mL de etanol de pureza HPLC con el fin de macerar el producto obtenido. Cada experimento se repitió tres veces con el fin de disponer de suficiente estadística.

La maceración se llevó a cabo durante 4 semanas, transcurridas las mismas se analizó el contenido de trans-resveratrol en cada una de las muestras<sup>a</sup>. Para ello, empleó un sistema cromatográfico consistente en: cromatógrafo líquido que emplea una bomba PU-1580 junto con un controlador de gradiente LG-1580-02 de la marca Jasco, un sistema de vacío 154 Gastorr, una válvula de inyección Rheodyne 77251 para volúmenes de 20  $\mu\text{L}$ , un detector espectrofotométrico UV-1575 y una estación de trabajo LC-2000 Plus Series Jasco. La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente haciendo uso de una columna Tecknokroma Cromasyl C<sub>18</sub> ( $150 \times 4,6$ ) mm, 4  $\mu\text{m}$  y un salvacolumna ( $2 \times 4,6$ ) mm, 5  $\mu\text{m}$  de la misma fase estacionaria. Para filtrar la fase móvil se emplearon membranas (Millipore) de 0,45  $\mu\text{m}$ . También se empleó una bomba de vacío (Barna, USA).

La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante un gradiente lineal, de una fase móvil compuesta por metanol-ácido acético-agua (10:2:88 v/v) como disolvente A, y metanol-ácido acético-agua (90:2:8) como disolvente B con un caudal de 1,0 mL/min empleando las condiciones de gradiente dadas en la tabla 3.7.

---

<sup>a</sup> Los resultados obtenidos por la técnica de HPLC proceden de un estudio llevado a cabo por la profesora M<sup>a</sup> Jesús Santos y su equipo de investigación del departamento de Química Analítica de la Facultad de CC. Químicas de la UCM.

<b>t (min)</b>	<b>Q ( mL·min<sup>-1</sup>)</b>	<b>B (%)</b>
0.0	1,0	15
5.0		35
10.0		35
20.0		100
25.0		100
28.0		15

Tabla 3.7. *Condiciones de gradiente empleadas en la separación de trans-resveratrol en los extractos de piel de uva.*

La longitud de onda empleada en el detector espectrofotométrico fue de 306 nm como característica para el análisis por HPLC del trans-resveratrol. Por contacto con la luz del sol la isomerización trans-cis transcurre con una eficiencia próxima al 100%. En este sentido, se pudo caracterizar el pico correspondiente al trans-resveratrol por la comparación directa de dos muestras, una sometida a la acción solar y otra aislada del sol.

Para la cuantificación del contenido de trans-resveratrol en las muestras se empleó la técnica de patrón externo. Tanto el patrón como las muestras se inyectaron en composiciones similares en la fase móvil. La curva de calibración del patrón se estableció a partir de una representación del área del pico frente diferentes concentraciones en el intervalo 0,5-10  $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$  de trans-resveratrol. Las características analíticas para el patrón mostraron una linealidad en el intervalo estudiado con un  $R^2$  de 99,9868%. Un límite de detección ( $\text{LoD} = O_0 + 3 \cdot S_{y/x}$ ) de 0,13  $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$  y un límite de cuantificación de ( $\text{LoQ} = O_0 + 10 \cdot S_{y/x}$ ) de 0,44 13  $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ .

El programa de gradiente para la fase móvil empleado en la separación e identificación del trans-resveratrol en las muestras de uva y el caudal de 1,0 mL/min fueron los mismos que los empleados previamente para el análisis de trans-resveratrol en las hojas de vid según se puede observar en la tabla 3.1. El tiempo de análisis fue de 30 minutos, y el pico de trans-resveratrol eluyó a los 10,775 min. Las muestras fueron preparadas empleando el mismo volumen de muestra y una disolución de agua-ácido acético a pH 2,6.

La figura 3.23 muestra un cromatograma obtenido por HPLC y detección espectrofotométrica a la longitud de onda de 306 nm correspondiente a la muestra de control

(uvas no irradiadas). Para estas muestras se ha determinado una concentración de  $3,43 \pm 1,19$  mg/L de trans-resveratrol para el extracto etanólico que se ha obtenido en la curva de calibración previamente obtenida.

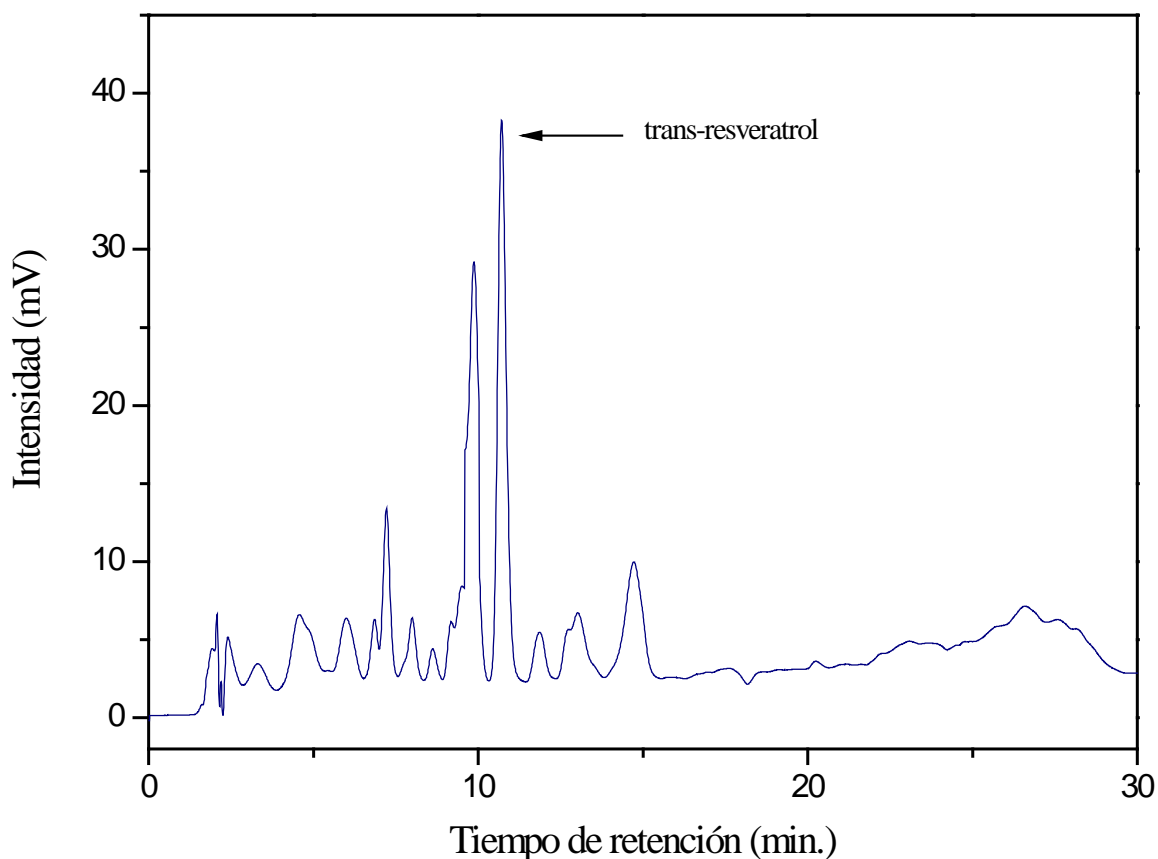


Figura 3.23. *Cromatograma obtenido por HPLC y detección espectrofotométrica a la longitud de onda de 306 nm correspondiente a la muestra de control (uva no irradiadas).*

Según se indicó al principio de este apartado, se han empleado dos longitudes de onda distintas para la irradiación de las muestras: 302,1 nm como longitud de onda resonante y 300,0 nm como longitud de onda no resonante. La figura 3.24 muestra el espectro REMPI del trans-resveratrol en donde se puede observar las distintas longitudes de onda empleadas en la realización de este experimento.

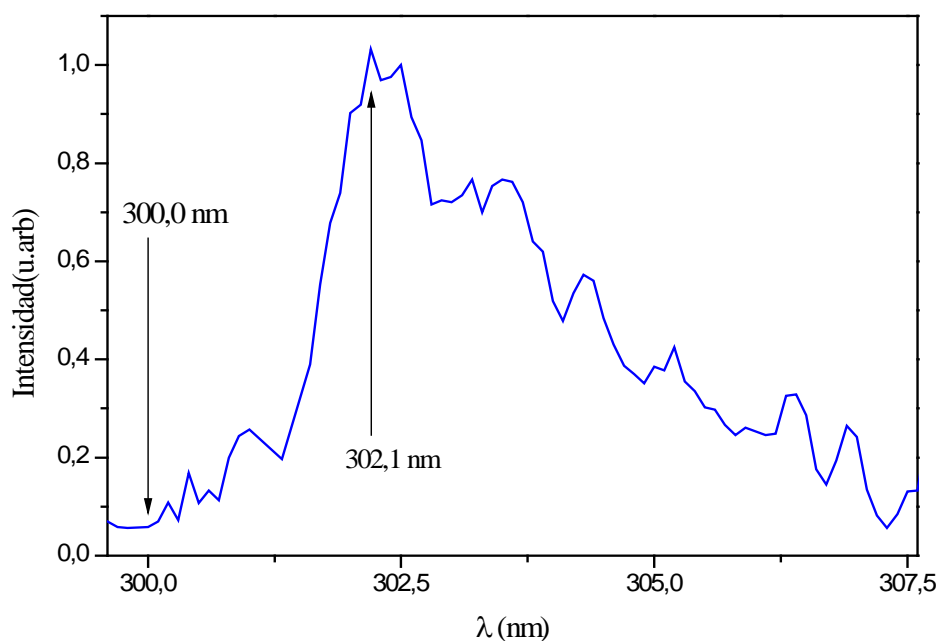


Figura 3.24. Espectro REMPI de la molécula de *trans*-resveratrol en el que se indican las dos longitudes de onda empleadas en la irradiación de las uvas.

En la figura 3.25 se muestran las diferencias entre dos cromatogramas obtenidos de dos muestras irradiadas durante el mismo tiempo de 45 minutos y las mismas condiciones con la excepción de que unas son irradiadas a 300,0 nm y las otras a 302,1 nm.

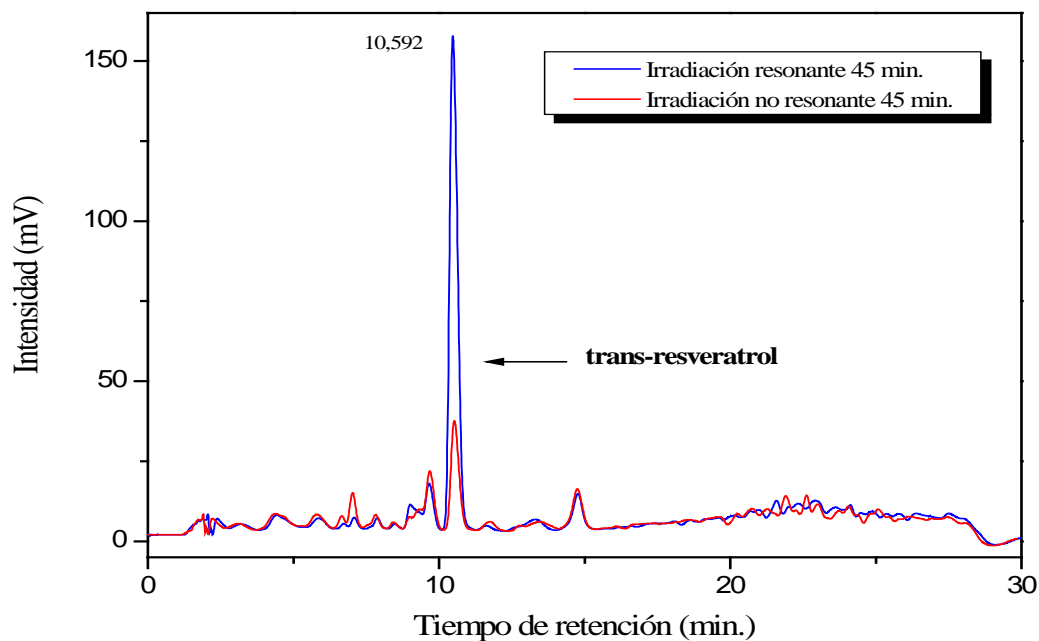


Figura 3.25. Cromatogramas correspondientes a las uvas irradiadas durante 45 minutos para las distintas longitudes de onda, resonante y no resonante.

El cromatograma rojo, obtenido para una muestra irradiada durante 45 minutos con longitud de onda no resonante, se muestra solamente un pequeño aumento en el pico de trans-resveratrol en comparación con el obtenido en las muestras de control mostrado en la figura 3.23, por el contrario el cromatograma azul muestra claramente un aumento como consecuencia del proceso de irradiación a la longitud de onda resonante.

Todos los extractos se analizaron empleando las condiciones óptimas que se han indicado y para evitar cualquier influencia en el análisis, las muestras fueron proporcionadas de forma aleatoria e identificadas sólo mediante un número. Los resultados se muestran en la tabla 3.8

Muestra	A ( $\mu\text{V}\times\text{s}$ )	[ ] ( $\text{mg}\times\text{L}^{-1}$ )
1	299577	2,9
2	477028	4,8
3	350287	3,5
4	247059	2,4
5	663154	6,7
6	1869820	19
7	320371	3,2
8	372893	3,7
9	460610	4,6
10	286044	2,8
11	704474	7,1
12	168683	1,6
13	814353	8,2
14	1442940	14,6
15	205381	2,0
16	134086	1,2
17	2972162	30,3
18	452541	4,5
19	217878	2,1
20	217616	2,1
21	403766	4,0
22	294693	2,9
23	302500	3,0
24	368497	3,6
25	244134	2,4
26	262065	2,6
27	363283	3,6

Tabla 3.8. *Concentración de trans-resveratrol en las muestras analizadas por RP-HPLC.*

La representación de los resultados obtenidos en la tabla 3.8 se muestra en la figura 3.26 en donde se representa el contenido en trans-resveratrol en los extractos frente al tiempo de irradiación tanto para las muestras irradiadas con longitud de onda resonante como no resonante.

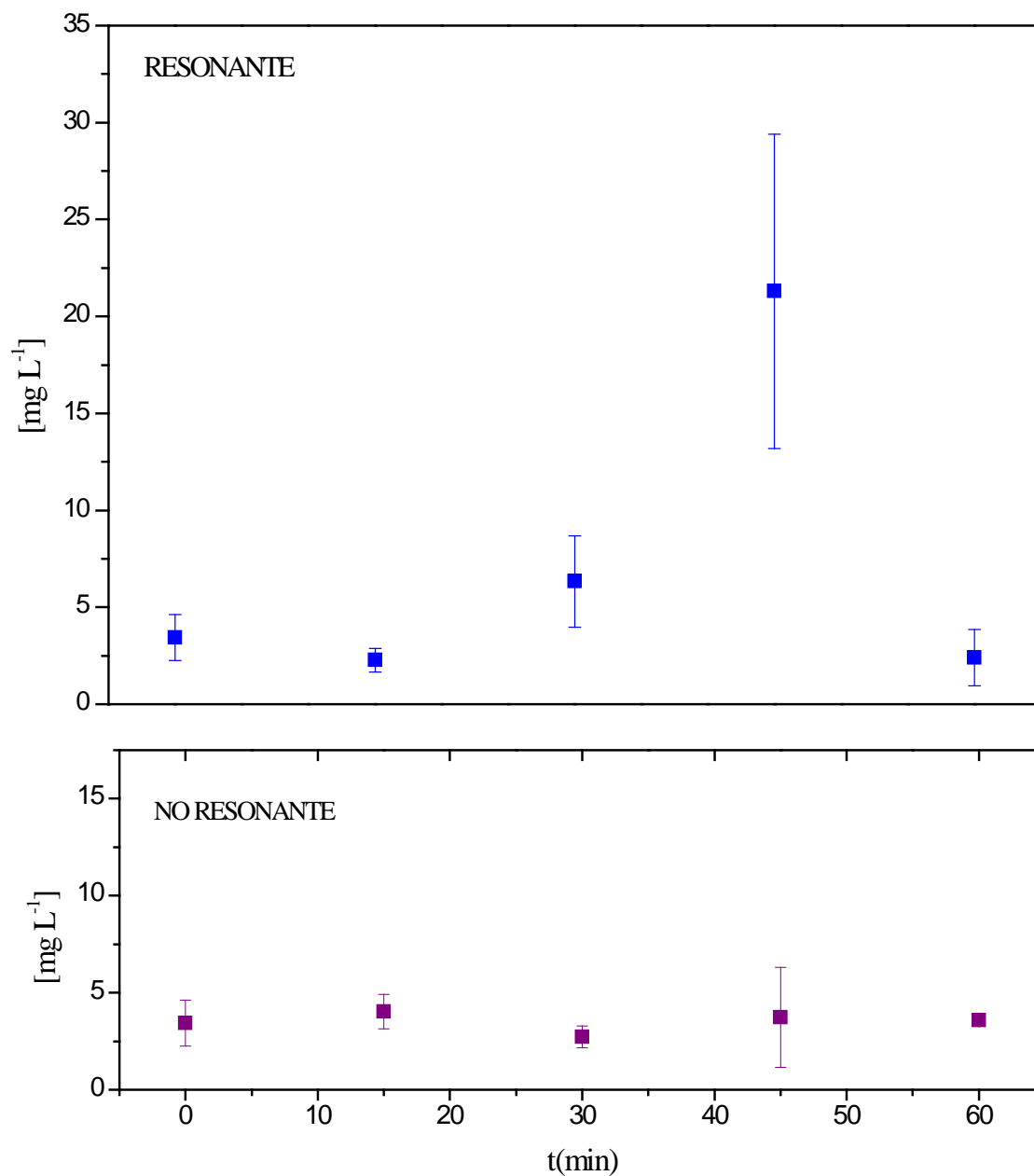


Figura 3.26. Evolución del contenido de trans-resveratrol para las distintas irradiaciones, resonante y no resonante.

Resulta evidente que la irradiación con una longitud de onda resonante para el trans-resveratrol tiene como resultado una elicitación del compuesto alcanzando un aumento en 6 veces para las muestras irradiadas durante 45 minutos en comparación con las de

concentración inicial; por el contrario las uvas irradiadas a 300 nm no muestran una variación significativa en el contenido en trans-resveratrol.

### 3.3.4. APLICACIÓN EXTERNA DE EXTRACTOS NATURALES OBTENIDOS DE LA VID COMO MÉTODO DE AUMENTO DE LA RESISTENCIA DE LA UVA A LA INFECCIÓN Y MADURACIÓN.

Como se indicó en la introducción, uno de los principales problemas de la agricultura moderna son las pérdidas en frutas y verduras durante el almacenamiento posterior a la cosecha, causadas principalmente por el ataque de agentes patógenos y su propio envejecimiento natural. Aunque existen prácticas agrícolas bien establecidas para la protección de los vegetales durante el almacenamiento, como la utilización de pesticidas químicos o el almacenamiento en atmósfera controlada, las pérdidas después de la cosecha se sitúan en torno al 20% del total mundial, pudiendo llegar en algunos casos a valores mucho más elevados. Además existe en la actualidad una gran preocupación de los consumidores respecto a los riesgos nocivos para la salud y para el medio ambiente que supone la utilización extensiva de pesticidas químicos.

Una nueva estrategia para solucionar estos problemas consiste en el desarrollo de métodos para mejorar la resistencia natural de frutas y verduras mediante la utilización de las propias moléculas sintetizadas por las plantas para su defensa, los denominados “conservantes naturales”.

En previos trabajos de nuestro grupo de investigación se investigó la aplicación externa de trans-resveratrol para mejorar la durabilidad de las uvas durante el almacenamiento<sup>175,210</sup>. Posteriormente este estudio se extendió a otras frutas<sup>176</sup> como manzanas, aguacates, etc. En este trabajo se presentan los resultados de la aplicación externa de un extracto etanólico natural obtenido a partir de la hoja de vid para mejorar el tiempo de durabilidad de las uvas, aumentando su resistencia a la infección y maduración.

La materia prima para la obtención del extracto puede ser tanto hoja de vid, como piel de uva obtenida como residuo en los procesos de vinificación o fabricación de zumos, etc. Para llevar a cabo los ensayos que aquí se presentan se empleó un extracto obtenido a partir

de hoja de vid; para ello, se tomaron 3,5 Kg de hoja de vid que se introdujeron en 8 litros de etanol debido al gran poder de disolución de los compuestos polifenólicos en etanol, en un recipiente opaco, y se mantuvo durante 7 semanas en maceración. Transcurrido este tiempo se separó la disolución etanólica del residuo sólido mediante filtración con lana de vidrio. El extracto etanólico así obtenido se concentró por evaporación del disolvente hasta reducir el volumen obtenido a la mitad.

Una vez obtenido el extracto etanólico concentrado, éste se utilizó para preparar una disolución al 5% en agua que será la utilizada para el tratamiento de las uvas.

Para los ensayos de aplicación externa de extracto se seleccionaron varios racimos de uva blanca de la variedad Moscatel de aproximadamente el mismo tamaño y peso, pertenecientes todos ellos a la misma variedad de uva comprada y sin haber sufrido ningún tratamiento de conservación posterior hasta el momento de la realización del experimento. El ensayo se puede realizar por inmersión, riego, lavado o fumigación, en este caso se realizó por inmersión

Para la realización de cada uno de los ensayos se tomaron 5 de los racimos que se usaron como blanco y se sumergieron en un recipiente con 1 L de agua; otros 5 racimos se sumergieron en una disolución de etanol al 5% en agua; por último, se sumergen otros 5 racimos en una disolución del extracto etanólico al 5% en agua de hoja de vid durante unos segundos.

La temperatura media a la que se realizó el almacenamiento fue de aproximadamente 25°C, siendo en todo momento superior a 20°C e inferior a 30°C. También se llevaron a cabo experimentos en los que las uvas han sido mantenidas en frigorífico a 8°C después del tratamiento.

Los resultados obtenidos tras un plazo de 10 días de almacenamiento a temperatura ambiente se muestran en la figura 3.27. Los racimos que fueron tratados solo con agua presentaban un estado avanzado de putrefacción como así lo indicaban los hongos que se habían desarrollado, los cuales estaban en un estado avanzado de su ciclo reproductivo. Los racimos que fueron tratados con la disolución al 5% de etanol presentan un estado muy



similar al primer grupo, aunque menos avanzado. Sin embargo, los racimos tratados con la disolución de extracto natural mostraban un aspecto todavía saludable sin ninguna muestra de infección fúngica ni de putrefacción.

Los resultados del experimento llevado a cabo a 8°C mostraron que este tipo de tratamiento permite también mejorar el tiempo de durabilidad de las uvas en frigorífico, de esta forma, tras 35 días de conservación en frigorífico a dicha temperatura, los resultados obtenidos son similares a los anteriores: las muestras tratadas sólo con agua o con la disolución al 5% de etanol presentaban un estado avanzado de envejecimiento e infección fúngica localizada, mientras que los racimos tratados con la disolución del extracto conservaban un aspecto saludable, como se puede observar en la figura 3.28.



Figura 3.27. Resultados correspondientes al experimento a temperatura ambiente.  
De superior a inferior: blanco; racimo con aplicación de disolución etanólica al 5%  
en agua; racimo con aplicación del extracto al 5% en agua.



Figura 3.28. Resultados correspondientes al experimento a 8°C. De superior a inferior: blanco; racimo con aplicación de disolución etanólica al 5% en agua; racimo con aplicación del extracto al 5% en agua.

## **4. RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ACOPLADAS A CROMATOGRAFÍA.**

#### 4.1. GC-REMPI-TOFMS.

El hecho de disponer de un sistema de ionización y detección tan selectivo como es el REMPI-TOFMS ha llevado a sustituirlo por el detector convencional presente en un GC con el fin de poder obtener una técnica acoplada que presente en su conjunto más ventajas que las que tiene cada técnica de manera individual.

Se ha diseñado y puesto a punto una técnica conjunta GC-REMPI-TOFMS con el fin de poder disponer de una separación cromatográfica como paso previo a la etapa de ionización y subsiguiente detección. El hecho de poder ionizar de forma selectiva cada uno de los elementos eluyentes se va a traducir en disponer de una mayor sensibilidad en la ionización para cada una de las sustancias individuales con respecto a un haz complejo compuesto por muchas sustancias, lo que va a redundar en una mejora en los límites de detección además, de disponer de espectros mucho más limpios dado que a lo sumo se tendrá el compuesto eluyente y partículas procedentes del sangrado de la columna.

Los compuestos que se han analizado con GC-REMPI-TOFMS presentan grupos fenilo que presentan una absorción REMPI en 266 nm. Por ello, con el fin de tener una visión de conjunto se ha ionizado con radiación láser de longitud de onda 266 nm. Además, la radiación de 266 nm es próxima a la longitud de onda de máxima absorción de la molécula de trans-estilbeno, por lo que nos permitirá validar la técnica con una molécula de un gran interés biológico.

A partir de los valores relativos obtenidos de los espectros de absorción para cada una de las moléculas según se muestra en la gráfica de la figura 4.1, se decidió emplear para la ionización del conjunto radiación láser procedente del cuarto armónico, 266 nm, de un láser BrilliantB en función a la excelente absorción que presentan todas las moléculas de la muestra para esa longitud de onda.

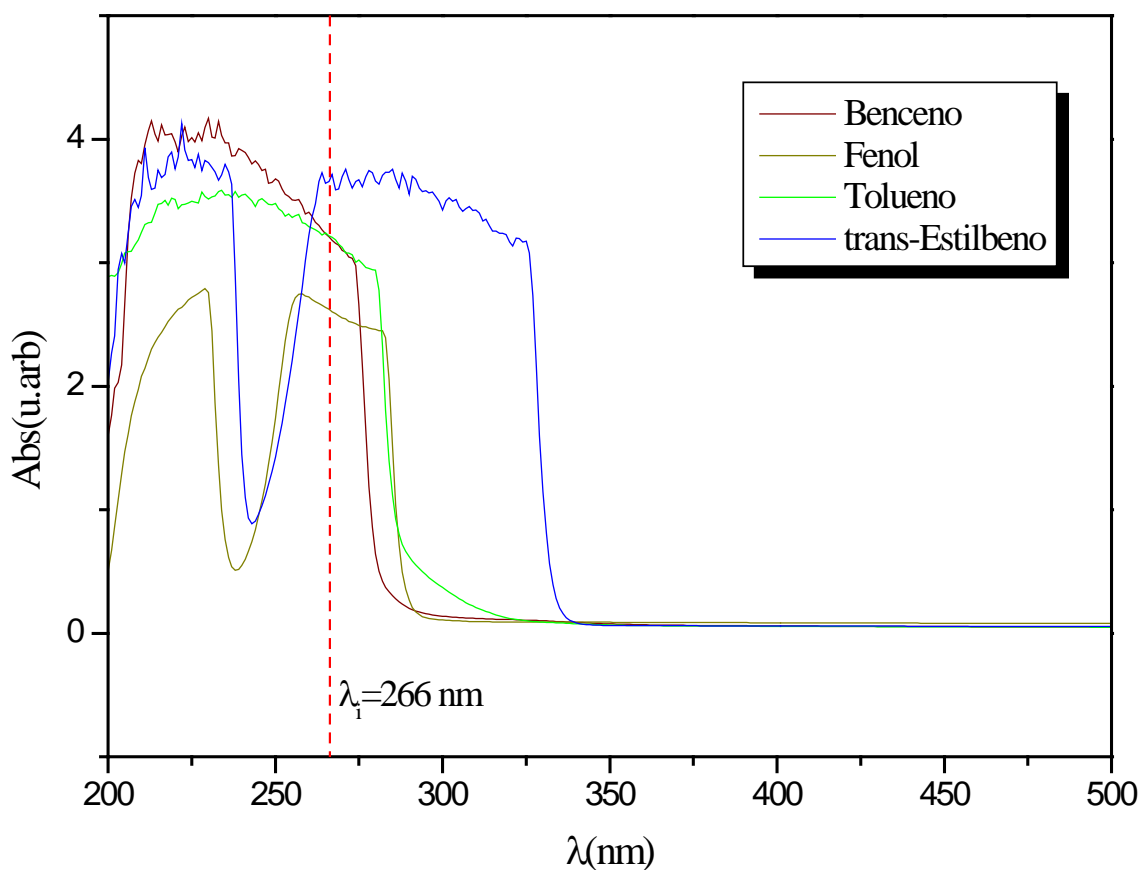


Figura 4.1. Espectro de absorción correspondiente a las moléculas de fenol, benceno, tolueno y trans-estilbeno.

En la tabla 4.6 se dan los valores de masa y de densidad para cada una de las sustancias presentes en el recipiente.

Compuesto	M (g)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )
Benceno	17,290	0,863-0,866
Tolueno	17,580	0,877-0,881
Fenol	$2 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-5}$
trans-Estilbeno	$2 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-5}$

Tabla 4.1. Valores de masa y densidad de las moléculas que se van a analizar.

#### **4.1.1. DETECCIÓN DE COMPUESTOS MEDIANTE GC.**

Una vez diseñada y puesta a punto la técnica GC-REMPI-TOFMS hay que proceder a su validación y para ello resulta conveniente e interesante el disponer de una molécula cuyo análisis directo resulte abordable con la técnica GC.

Como se ha citado en la introducción, el análisis de trans-resveratrol por GC requiere la utilización de técnicas de pretratamiento y de obtención de derivados de menor temperatura de vaporización con el fin de evitar la fragmentación en la etapa de inyección. Estos procedimientos introducen numerosas fuentes de error (isomerización trans→cis, pérdidas de analito en las diferentes etapas, etc.), por lo que, con el fin de disponer de una molécula que permitiera realizar el análisis directo por GC-REMPI-TOFMS, se eligió como analito otra molécula de interés biológico: el trans-estilbeno, cuyas propiedades químico-físicas permiten dicho análisis.

##### **4.1.1.1 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS DEL trans-ESTILBENO.**

Con el fin de disponer de un programa adecuado para la detección de trans-estilbeno por GC se partieron de datos bibliográficos<sup>211,212</sup> que probaron dar muy buena reproducibilidad. Sin embargo, el tiempo de elución del trans-estilbeno con estos programas era excesivo. Con la nueva columna cromatográfica resultó factible la modificación en el programa de temperaturas con el fin de obtener tiempos de elución más cortos para la molécula de trans-estilbeno.

Para ello se preparó una disolución de 50 µg/mL de trans-estilbeno en metanol, de dicha disolución se inyectó 1 µL en el cromatógrafo en donde previamente se pusieron las siguientes condiciones:

$$T_{\text{Inyector}} = 260\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$T_{\text{Detector}} = 290\text{ }^{\circ}\text{C}$$

Etapa	T (°C)	v (°C/min)	t <sub>e</sub> (min)	t <sub>total</sub> (min)
Inicial	220	-	2,00	2,00
1	310	40,0	6,00	10,00

Tabla 4.2. *Rampa de temperatura para el trans-estilbeno con  $T_{\text{Inyector}} = 260\text{ °C}$  y  $T_{\text{Detector}} = 290\text{ °C}$ .*

El cromatograma obtenido con estas condiciones de análisis se muestra en la figura 4.2.

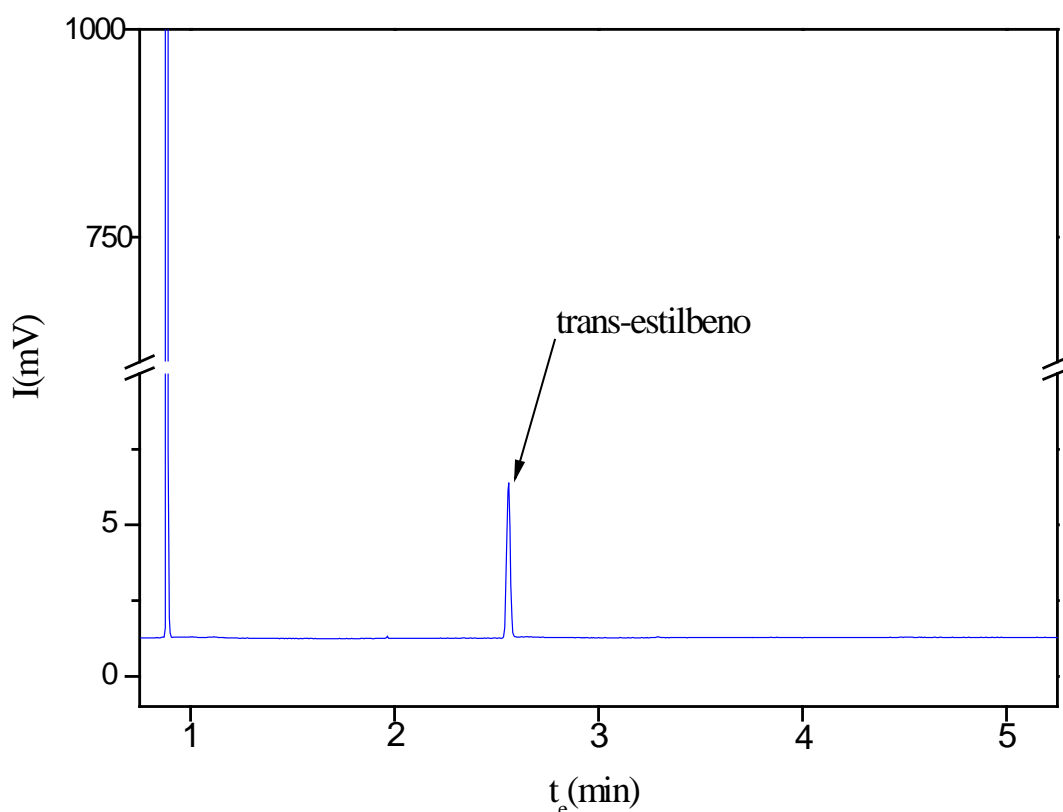


Figura 4.2. *Cromatograma de trans-estilbeno obtenido a partir de una disolución de 50 µg/mL de trans-estilbeno en metanol.*

De diferentes inyecciones que mostraron cromatogramas como el de la figura 4.2, con el fin de disponer de una estadística, se desprende que el tiempo de retención para el caso del trans-estilbeno, considerando 9 grados de libertad y un nivel de probabilidad del 95%, es de  $2,65 \pm 0,03$  minutos.

A continuación se van a definir una serie de parámetros cromatográficos<sup>213</sup> característicos para el sistema de GC que se está empleando en el análisis del trans-estilbeno,

para ello se efectuaron las medidas tomando como patrón interno el fenol. El recipiente de mezcla contenía 2 mL de una disolución de 50  $\mu\text{g/mL}$  de fenol junto con 50  $\mu\text{g/mL}$  de trans-estilbeno y todo ello en metanol, de modo que un cromatograma característico para estas condiciones se presenta en la figura 4.3.

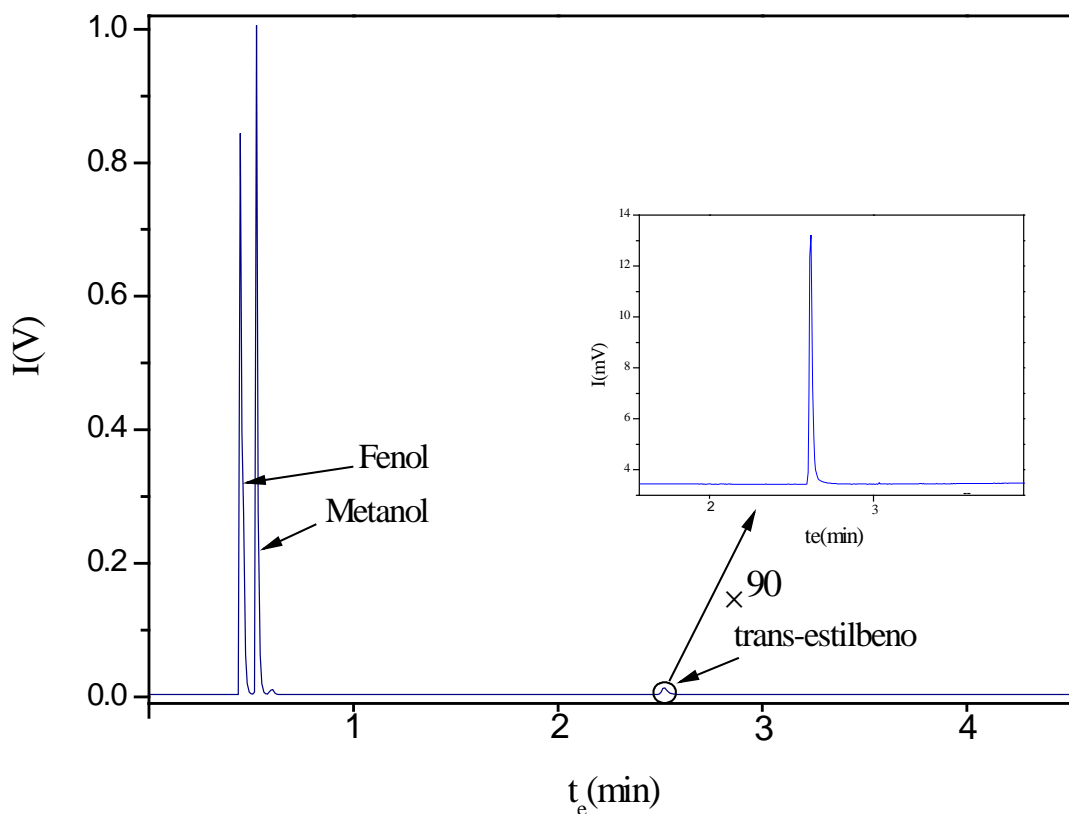


Figura 4.3. *Cromatograma correspondiente a una mezcla trans-estilbeno y fenol en metanol.*

La asignación de cada uno de los picos se realizó en base a la inyección de cada uno de los compuestos de manera individual.

El tiempo de elución del fenol que se desprende de la figura 4.2, para un mismo nivel de probabilidad que el trans-estilbeno, resultó ser de  $0,594 \pm 0,005$  minutos.

En la tabla 4.3 se dan los valores de los principales parámetros cromatográficos derivados de cromatogramas como los de la figura 4.3.



Molécula	Parámetro Cromatográfico	Valor
trans-estilbeno	Anchura de pico ( $w_b$ ).	$1,5 \pm 0,1$ s
trans-estilbeno	Area de pico (S).	$0,0338 \text{ min} \times \text{mV}$
trans-estilbeno	Eficacia <sup>a</sup> (N).	$(3,8 \pm 0,5) \times 10^5$
trans-estilbeno	Altura equivalente <sup>b</sup> (h)	$(8 \pm 1) \times 10^{-5}$
fenol + trans-estilbeno	Resolución <sup>c</sup> (R)	$154 \pm 8$
fenol + trans-estilbeno	Factor de sensibilidad <sup>d</sup> ( $\alpha$ )	$9,75 \pm 0,06$

Tabla 4.3. *Parámetros cromatográficos obtenidos para el sistema fenol y trans-estilbeno.*

#### 4.1.1.2 DETECCIÓN CROMATOGRÁFICA DE UNA MEZCLA DE MOLÉCULAS CONOCIDAS.

Se ha elegido el trans-estilbeno, que es el compuesto de interés, mezclado con tolueno, benceno y fenol por ser tres disolventes difíciles de resolver cromatográficamente lo que posteriormente nos permitirá comprobar la eficacia de la conexión con el sistema REMPI-TOFMS en cuanto a separación de compuestos se refiere.

Debido a que los compuestos benceno y tolueno presentan las características básicas de disolventes en cromatografía gaseosa, volátiles y de relativamente bajo peso molecular, con el fin de que sus señales no resultaran enmascaradas por sustancias de características similares, el fenol que a temperatura ambiente es sólido se añadió a la mezcla de benceno y

<sup>a</sup> La eficacia de una columna cromatográfica viene determinada por el número de platos teóricos, siendo la expresión para su cálculo  $N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2$

<sup>b</sup> La altura equivalente de un plato teórico se calcula en base a la expresión  $h = \frac{L}{N}$  con L la longitud de la columna cromatográfica.

<sup>c</sup> Para el cálculo de la resolución se ha hecho uso de la expresión  $R = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_{b,1} + w_{b,2}}$ .

<sup>d</sup> Para el cálculo del factor de selectividad se ha hecho uso de la expresión  $\alpha = \frac{t_{R,1} - t_m}{t_{R,2} - t_m}$ .

tolueno, sin disolución previa en otro disolvente, al igual que el trans-estilbeno resultando las cantidades que figuran en la tabla 4.4.

Compuesto	[ ]
Benceno	0,5 (v/v)
Tolueno	0,5(v/v)
Fenol <sup>a</sup>	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$
trans-estilbeno <sup>b</sup>	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$

Tabla 4.4 *Contenido del recipiente de mezcla para el análisis por GC-REMPI-TOFMS.*

Con el fin de obtener un cromatograma en el que figuren todos estos compuestos de manera nítida y resolución óptimas, se inyectó de la manera lo más rápida posible con el fin de minimizar el ensanchamiento de banda que se produce de una inyección lenta.

Debido a que las moléculas presentes estaban en concentraciones adecuadas para ser detectadas por nuestro cromatógrafo de gases sin problemas se recurrió a la forma de trabajo en *split* en relación 1:10 dado que con este modo de trabajo, la cantidad de muestra introducida en la columna es muy pequeña y la velocidad de flujo elevada con lo que se obtendrán mejores resoluciones<sup>214</sup>.

Dado que la temperatura es una de las vías más fáciles y efectivas de separación, era requisito imprescindible que el puerto de inyección esté lo suficientemente caliente para vaporizar la muestra rápidamente, esto es, sin llegar a una pérdida de eficacia en la técnica de inyección, por otra parte el puerto de inyección debe estar a suficiente baja temperatura como para evitar la descomposición térmica de los compuestos e incurrir en una posible reorganización química.

<sup>a</sup> Se añadieron 2 mg de fenol en un volumen de 40 mL correspondientes a las sustancias líquidas presentes en el recipiente.

<sup>b</sup> Análogamente al caso del fenol, la cantidad de trans-estilbeno añadida fue de 2 mg en el mismo volumen líquido.

Se procuró trabajar lo más alejado posible del punto de ebullición de los compuestos ya que la columna opera a temperaturas en los que la muestra está en estado de vapor y no es necesario que esté en estado gaseoso siguiendo el criterio de que la temperatura de la columna debe mantenerse encima del punto de rocío de la muestra pero no encima del punto de ebullición<sup>215</sup>.

Si la temperatura es muy baja, la presión de vapor de los componentes de la muestra es baja y por consiguiente su movimiento resultará lento a través de la columna. De modo que a mayor temperatura disminuye el tiempo de retención y aumentando más la temperatura el análisis se completa en menor tiempo pero con una disminución de la resolución. Con temperaturas más bajas los tiempos de análisis son mayores pero la resolución es mejor.

En cuanto a la temperatura del detector, si la temperatura es muy baja puede ocurrir condensación, ensanchamiento de pico e incluso pérdida total de picos. La conductividad térmica debe controlarse en  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . En el caso del detector FID que es el detector con el que se han obtenido los cromatogramas la temperatura mínima de trabajo debe ser de  $125^{\circ}\text{C}$  con el fin de evitar condensación de agua y un consiguiente empeoramiento en los cromatogramas obtenidos.

Con todo, se han de analizar todos los parámetros con el fin de obtener las condiciones óptimas de resolución de los compuestos de la mezcla. El trans-estilbeno presenta una temperatura de evaporación de  $306,4^{\circ}\text{C}$ <sup>216</sup>. El hecho de presentar una temperatura de ebullición tan alta hace que la mejor de las opciones sea el trabajar con una rampa programada de temperatura sin llegar al punto de vaporización en el inyector sino aprovechar su elevada presión de vapor. Por otra parte, debido a la gran volatilidad del resto de componentes de la muestra se daría pie a la combinación de especies químicas.

Aplicando las condiciones de la tabla 4.2 para la inyección directa de  $1\ \mu\text{L}$  de la mezcla se obtiene el cromatograma que se presenta en la figura 4.4 en la que se muestra el tiempo de elución para cada una de las sustancias presentes en la muestra, el hecho de no poder resolver mejor los primeros picos correspondientes al tolueno, benceno y fenol respectivamente es debido a que la elevada temperatura hace que este tipo de moléculas que

presentan una gran presión de vapor eluyan muy rápidamente y por consiguiente resulte una zona muy congestionada.

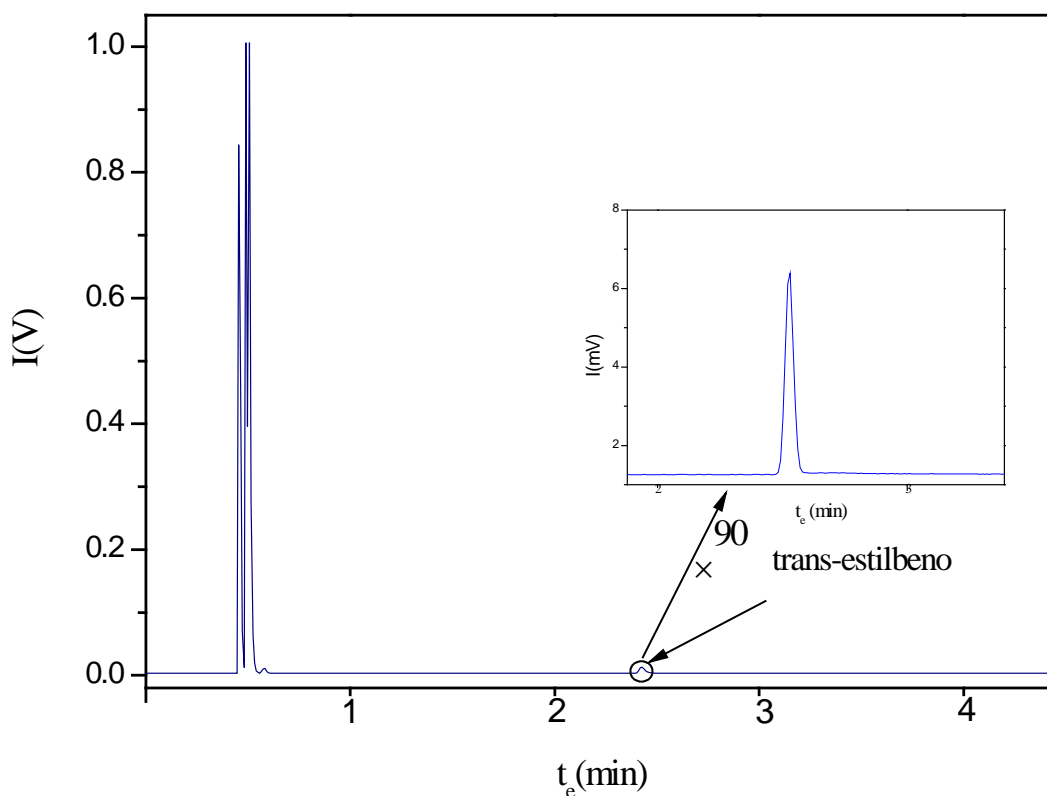


Figura 4.4. Cromatograma correspondiente a la mezcla fenol, benceno, tolueno y *trans*-estilbeno.

Con el fin de identificar cada uno de los picos, se hace uso de inyecciones individuales de cada uno de los componentes de la mezcla para de esa forma poder asignar cada tiempo de elución a cada compuesto particular, resultando los tiempos que se muestran en la tabla 4.5.

Compuesto	$t_{\text{elución}} (min)$
Benceno	0,527
Tolueno	0,572
Fenol	0,594
<i>trans</i> -estilbeno	2,650

Tabla 4.5. Caracterización cromatográfica por tiempos de elución de los compuestos de la mezcla.

#### 4.1.2. MEDIDA DE PATRONES PUROS POR GC-REMPI-TOFMS.

La mezcla estudiada anteriormente por cromatografía se estudió a continuación haciendo uso de la técnica conjunta GC-REMPI-TOFMS.

Se inyectó 1µL de mezcla en el cromatógrafo de gases de modo que el tiempo transcurrido hasta llegar al punto de ionización está dado por:

$$t_t = t_e + t_d + t_{TOF}$$

Siendo:

$t_t$  = tiempo transcurrido hasta que los compuestos son detectados en las placas microcanales una vez que han sido inyectados por el puerto de inyección del cromatógrafo.

$t_e$  = tiempo de elución característico para cada uno de los compuestos.

$t_d$  = tiempo de recorrido libre desde que eluyen hasta que son ionizados.

$t_{TOF}$  = tiempo de vuelo característico una vez que el compuesto es ionizado.

Dado que  $t_e + t_d \gg t_{TOF}$  se pueden aproximar los tiempos en que son detectados mediante el espectrómetro de tiempo de vuelo al tiempo  $t_d + t_e$ . Más aún, conocidos los tiempos de elución caracterizados por GC, se puede caracterizar cada uno de los compuestos en función de su tiempo de paso a lo largo de la conexión de unión entre el cromatógrafo de gases y la técnica REMPI-TOFMS una vez que han eluido, esto es,  $t_d$ , que para el caso concreto de la mezcla que se está tratando estos tiempos están dados en la tabla 4.6.

Compuesto	$t_d \pm 0,05$ seg
Benceno	9,32
Tolueno	10,05
Fenol	12,21
trans-Estilbeno	65,07

Tabla 4.6. *Tiempos de recorrido desde la elución hasta la ionización.*

Para ionizar las moléculas se empleó un láser Brilliant B en su cuarto armónico y con una caja de retraso de pulsos (BOXCAR) se optimizó la señal. Con el fin de asignar la escala de tiempos se introdujo tolueno a través de la válvula de aguja (WHITNEY 316) preparada para tal efecto en la cámara de ionización. Este pico, indudablemente debe coincidir con el pico de tolueno procedente del cromatógrafo. De modo que una vez asignada la escala de tiempos, los resultados correspondientes a la detección de una mezcla de compuestos por la técnica GC-REMPI-TOFMS se pueden observar en la figura 4.5.

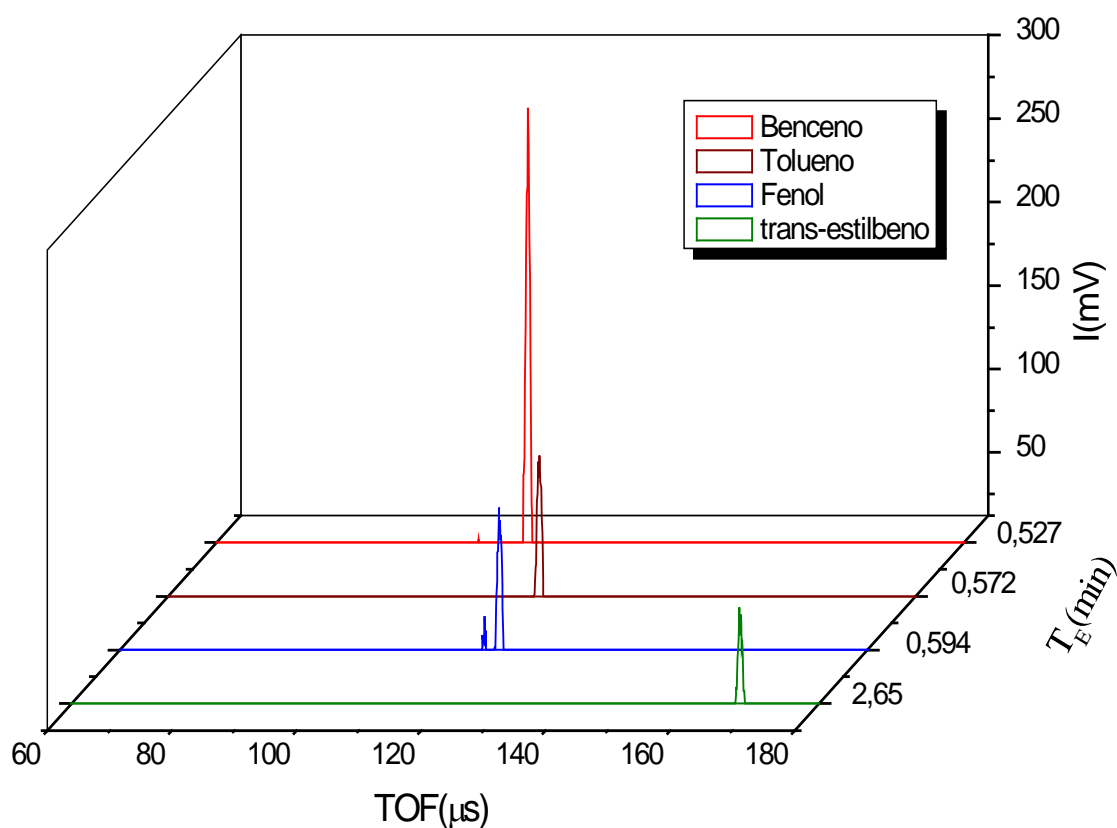


Figura 4.5. Elución de moléculas y caracterización por tiempo de vuelo según la técnica GC-REMPI-TOFMS.

Los valores experimentales para la obtención de los espectros de la gráfica 4.5 han sido:

GC

$T_{\text{Inyector}} = 260\text{ }^{\circ}\text{C}.$

$T_{\text{Detector}} = 290\text{ }^{\circ}\text{C}.$

$\phi(\text{N}_2 \text{ Columna}) = 1 \text{ mL/min.}$

Programa de temperatura

Etapa	T (°C)	v (°C/min)	t (min)	t <sub>total</sub> (min)
Inicial	220	-	2,00	2,00
1	310	40,0	6,00	10,00

### CONEXIÓN

$T = 100 \pm 10 \text{ °C}$

### CÁMARA DE IONIZACIÓN.

$P = 3,6 \times 10^{-6} \text{ mbar.}$

### CÁMARA DE TIEMPO DE VUELO.

$P = 1,1 \times 10^{-6} \text{ mbar.}$

### LÁSER DE IONIZACIÓN.

Retraso de las lámparas de destello-Parámetro Q = 320  $\mu\text{s}$ .

$E_i = 350 \text{ } \mu\text{J/pulso}$

## **4.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA GC-REMPI-TOFMS PARA EL ANÁLISIS DE trans-ESTILBENO.**

Hoy en día los laboratorios deben de demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables<sup>217</sup> y adecuados para su finalidad o propósito perseguido ya que muchas decisiones están basadas en los resultados que estos proporcionan. Los laboratorios deben validar<sup>218</sup> todos los métodos que se utilicen en el mismo, tanto los

desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios.

Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos por el usuario, para poder resolver el problema analítico. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables.

Los criterios de calidad considerados pueden ser de tipo estadístico<sup>219</sup> (veracidad, trazabilidad, precisión, incertidumbre, representatividad, sensibilidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez) o bien de tipo operativo/económico (inversión, mantenimiento, rapidez, facilidad de uso, simplicidad).

Mediante la aplicación del protocolo de normalización se obtuvo en forma experimental para la técnica GC-REMPI-TOFMS y para las condiciones particulares del laboratorio empleando como molécula de análisis el trans-estilbeno, los valores de los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico; estos parámetros son<sup>220</sup>: repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, selectividad, exactitud y se darán además un valor al límite de detección y al límite de cuantificación.

#### **4.2.1. REPETIBILIDAD.**

Se entiende por repetibilidad del sistema la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y la misma muestra de análisis durante un corto intervalo de tiempo.

Para calcular la repetibilidad, se empleó una muestra de 50 µg/mL de trans-estilbeno disuelta en etanol, de la cual se inyectó 1 µL en el cromatógrafo de gases donde previamente se dispusieron las condiciones dadas en el apartado 4.1.2, así como las condiciones de ionización dadas en el mismo apartado con la salvedad de que se monitorizó la energía durante todas las tomas de señal. En estas condiciones, tras esperar el  $t_d$  correspondiente característico de la molécula de trans-estilbeno, se obtiene la señal como promedio de 7



espectros correspondiendo cada uno a 50 disparos láser (5 segundos de tiempo de adquisición en el osciloscopio por cada espectro registrado), por lo que cada punto corresponderá a la media de 350 disparos láser.

Para poder normalizar la señal obtenida en función de la energía y con ello poder eliminar las fluctuaciones láser se ha de conocer el proceso de ionización para el trans-estilbeno. En este sentido, está documentada una absorción bifotónica<sup>221</sup> por parte de la molécula para una longitud de onda de 258 nm en donde presenta el máximo de absorción y cuya sección eficaz comprende la longitud de onda de 266 nm; así pues el proceso de dependencia con la energía láser se va a considerar cuadrático.

Los valores experimentales correspondientes a la repetibilidad se observan en la figura 4.6 en la que se representan 30 medidas correspondientes a 350 disparos láser cada uno de ellos, tal y como se ha comentado en el párrafo anterior. En la gráfica están representadas la media,  $\bar{x}$ , y las dos barras corresponden a la desviación estándar superior,  $s_s$ , e inferior,  $s_i$ .

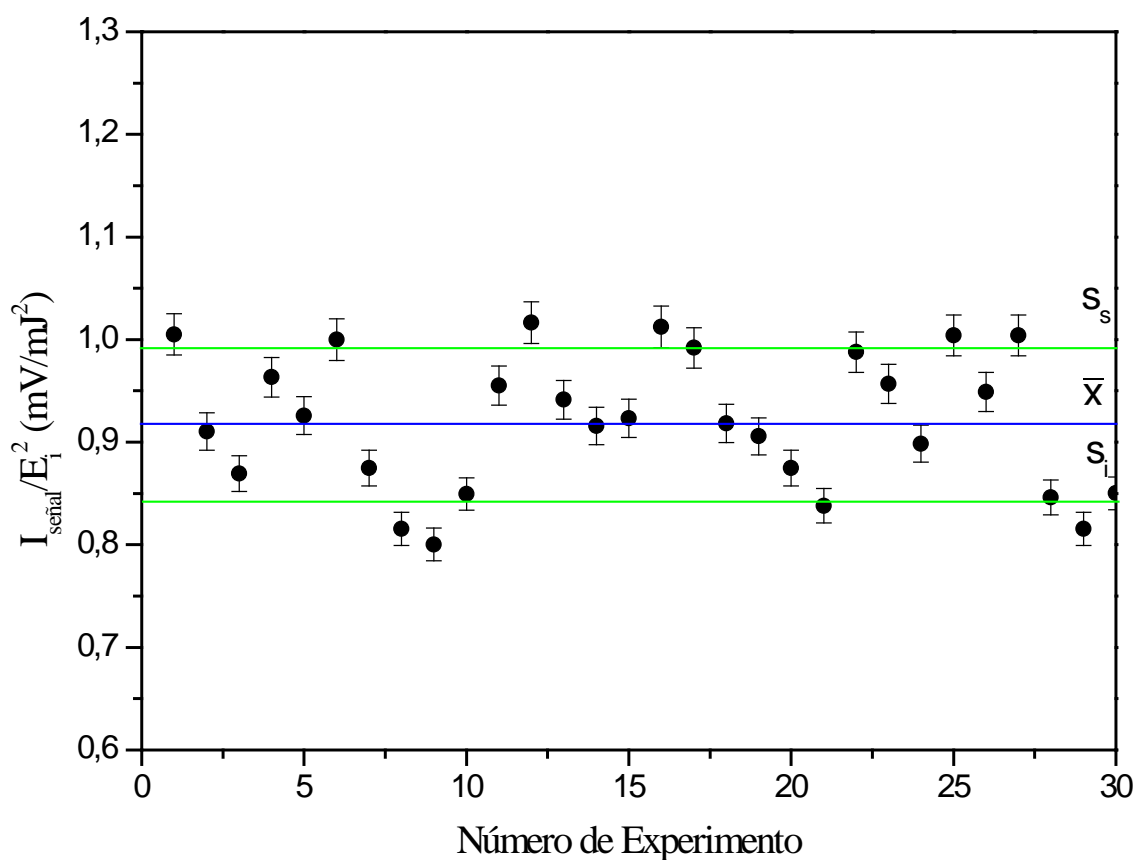


Figura 4.6. Experimento de repetibilidad para la técnica GC-REMPI-TOFMS.

El análisis estadístico de los resultados muestra una desviación estándar relativa o coeficiente de variación del 2,1%. Este valor indica la precisión interna de nuestro sistema, y refleja principalmente que no existen inhomogeneidades en el pulso gaseoso de la muestra lo que indica que las moléculas una vez que son inyectadas en la columna cromatográfica, atraviesan la conexión hasta llegar al punto de ionización de una manera muy homogénea, esto es, el paquete molecular que llega al punto de ionización es continuo y no discreto. En cuanto a la radiación ionizante, las posibles inhomogeneidades se eliminan por normalización con la señal.

#### **4.2.2. REPRODUCIBILIDAD.**

La reproducibilidad es la precisión del sistema bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo analito, pero con diferentes operadores, en diferentes tiempos, etc. La reproducibilidad proporciona la mayor variabilidad de los resultados ya que se obtiene cuando varían todos los factores posibles que pueden afectar al resultado.

Para el experimento de reproducibilidad, se preparó una disolución de partida de 50 µg/mL de trans-estilbeno puro en etanol. De esta disolución se tomaron sucesivamente volúmenes de 1 µL que se inyectaron en el cromatógrafo en modo de trabajo en *split* en relación 1:10. Las inyecciones fueron realizadas por distintos operadores en cada experimento tal como marca el protocolo.

En la figura 4.7 se muestra el área de pico de trans-estilbeno medido en la señal obtenida para cada una de las inyecciones realizadas. Cada punto es el resultado del promedio de cinco medidas calculadas cada una de ellas como el promedio de 50 disparos de láser, lo que proporciona una estadística de 250 valores experimentales por cada punto de la gráfica. La línea central indica la media de las medidas.

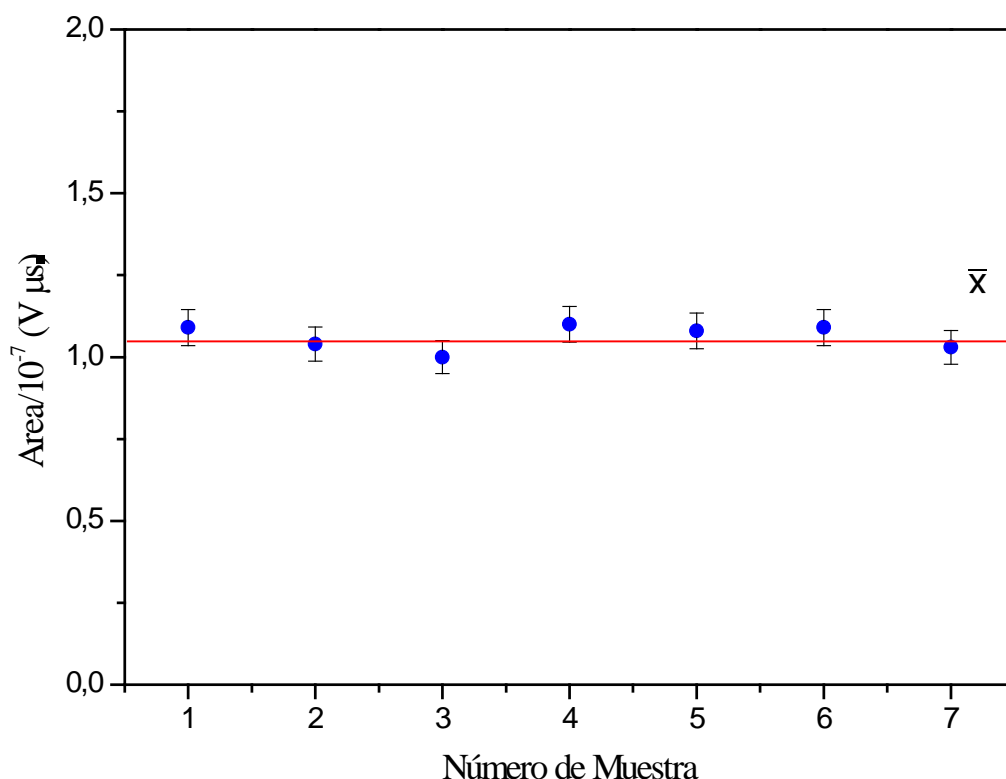


Figura 4.7. Experimento reproducibilidad para la técnica GC-REMPI-TOFMS.

El estudio estadístico de los datos, proporciona una desviación estándar relativa del 2,7%. En este resultado hay que incluir la forma de introducir la muestra por el operario así como fenómenos de fluctuación debidos a la variación de la temperatura en el gas portador que se podrían englobar dentro de los errores sistemáticos. Con el fin de eliminar el parámetro de fluctuación de la energía láser, las señales se han normalizado con el cuadrado de la energía.

#### 4.2.3. LINEALIDAD.

Con el propósito de comprobar que la intensidad de señal es linealmente proporcional a la concentración de analito, se estudió la relación entre ambos factores en el intervalo de interés analítico. Para ello, se prepararon 5 disoluciones de trans-estilbeno puro en un intervalo de concentraciones que oscilaron entre 20-50  $\mu\text{g/mL}$ .

En la figura 4.8 se puede apreciar la variación del área de la señal frente a la concentración de analito. Cada punto es la media de cinco puntos que a su vez es la media de

50 disparos láser, esto es, cada punto representa el promedio correspondiente a 250 espectros de tiempo de vuelo.

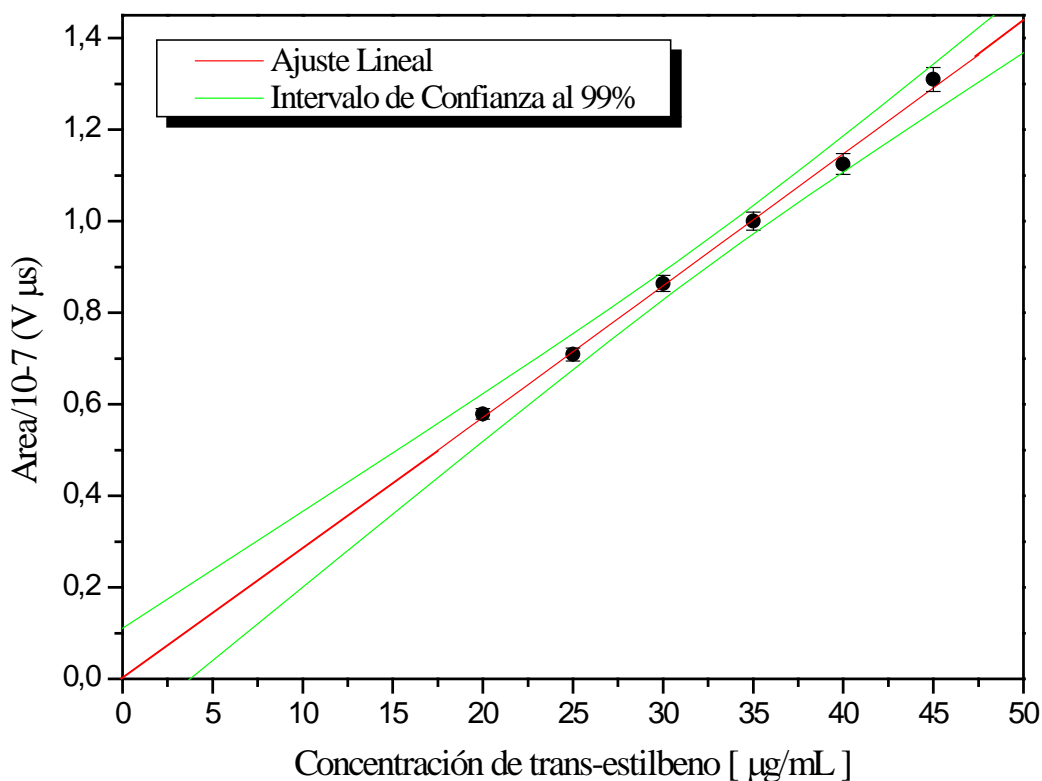


Figura 4.8. Experimento linealidad para la técnica GC-REMPI-TOFMS.

El coeficiente de correlación obtenido es de 0,998 lo que supone un buen ajuste de nuestros valores experimentales a una recta. Por otra parte la prolongación de la recta de ajuste intercepta con los ejes cartesianos en el origen de coordenadas, quedando el punto origen de coordenadas dentro del intervalo de confianza para un valor de probabilidad del 99%, por lo que se puede considerar que el intervalo de linealidad de la técnica es de 0-50 µg/mL.

#### 4.2.4. SELECTIVIDAD.

Una etapa común de la validación de métodos analíticos convencionales es la demostración de la especificidad o selectividad del método, es decir, el grado de certeza con que puede determinarse un analito particular dentro de una mezcla compleja sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.

Como ya se indicó en la introducción, en el caso de la técnica REMPI-TOFMS la selectividad está doblemente asegurada. Por un lado la ionización resonante que, al transcurrir a través de estados electrónicos reales, hace que sea posible ionizar únicamente un compuesto determinado en una mezcla compleja. Por otra parte la espectrometría de masas permite además discriminar los complejos en función de su masa molecular.

En el caso de acoplarle un cromatógrafo, los compuestos eluyentes son detectados bajo el mismo principio químico-físico que subyace para la técnica REMPI-TOF. Por todo ello, se ha desestimado el hecho de realizar ensayos de selectividad.

#### **4.2.5. EXACTITUD.**

Se define exactitud como el grado de concordancia entre el resultado del valor obtenido experimentalmente de una medición y su valor de referencia aceptado. Cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los componentes aleatorios y de un error sistemático común.

El método general para evaluar la exactitud consiste en analizar una muestra de concentración conocida y comparar la medida con el valor verdadero, esto requiere disponer de un material de referencia certificado el cual no está disponible comercialmente para el caso del trans-estilbeno, por consiguiente hay que recurrir a la determinación de la exactitud de nuestro método por la medida que proporciona el sistema en la detección de la concentración de trans-estilbeno para una disolución patrón del mismo preparada para tal fin con la mayor precisión posible.

Se procedió a preparar una disolución patrón con el fin de que la recta de calibrado obtenida en la figura 4.9 proporcione el valor de la concentración de trans-estilbeno a partir de la señal obtenida en el osciloscopio correspondiente a la medida de dicha disolución patrón. Por consiguiente, se preparó una disolución de  $38 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  de trans-estilbeno en etanol de modo que de la recta de calibrado, se obtiene el siguiente resultado que se aprecia en la figura 4.10.

La muestra de 1  $\mu\text{L}$  inyectada en el cromatógrafo proporciona una intensidad de señal que corresponde a un área de  $1,09 \cdot 10^{-7} \text{ V} \cdot \mu\text{s}$  que traducido a  $\mu\text{g/mL}$  de la recta de calibrado proporciona un valor de 38,09  $\mu\text{g/mL}$ .

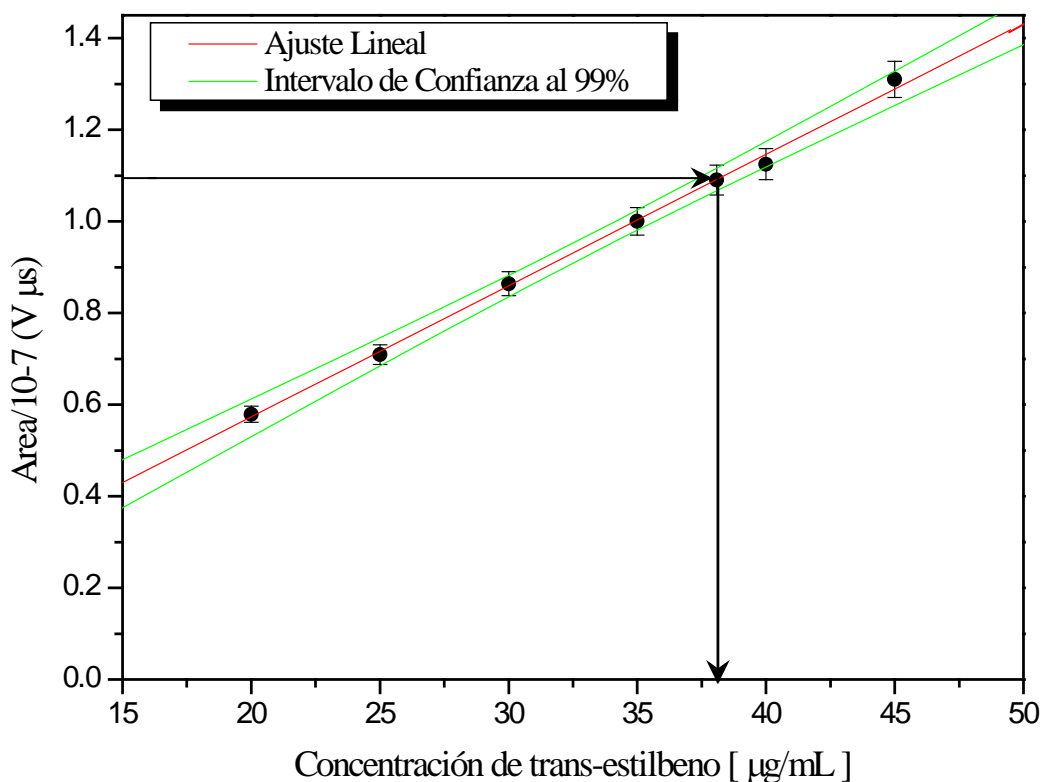


Figura 4.9. Cálculo de la exactitud para la técnica GC-REMPI-TOFMS.

Si se compara el valor obtenido de esta manera con el valor real del contenido de la disolución en trans-estilbeno se obtiene un error relativo de 0,23%. Lo que proporciona un valor en la exactitud de 99,77%.

#### 4.2.6. LÍMITE DE DETECCIÓN.

Se define el límite de detección de una técnica analítica, como la mínima concentración que produce una respuesta detectable por encima del nivel de ruido del sistema. Generalmente se toma como tres veces la desviación estándar del blanco.

En la gráfica de la figura 4.11 se muestra un espectro de masas obtenido para la molécula de trans-estilbeno procedente de la inyección de 1  $\mu\text{L}$  de una disolución cuyo

contenido en trans-estilbeno es de 50 µg/mL en etanol. El modo de trabajo es en modo *split* con una relación de *split* de 1 a 10 con lo cual pudiera decirse que por la línea de transferencia va una concentración de  $\frac{1}{200} \frac{mg}{ml}$ .

La intensidad de señal correspondiente al espectro de la figura 4.10 es de 271,87 mV y el promedio de ruido es de 0,07 mV, por lo que se obtiene una relación señal/ruido de 3883,8 para esta muestra de trans-estilbeno. Tomando el límite de detección como tres veces el nivel de ruido se obtiene un valor para dicho límite de detección de 3,8 µg/mL según se desprende del cálculo:

$$\frac{3}{3883,8} \frac{1}{200} \frac{mg}{ml} \frac{1}{10^{-3} \frac{L}{mL}} = 3,8 \frac{\mu g}{L}$$

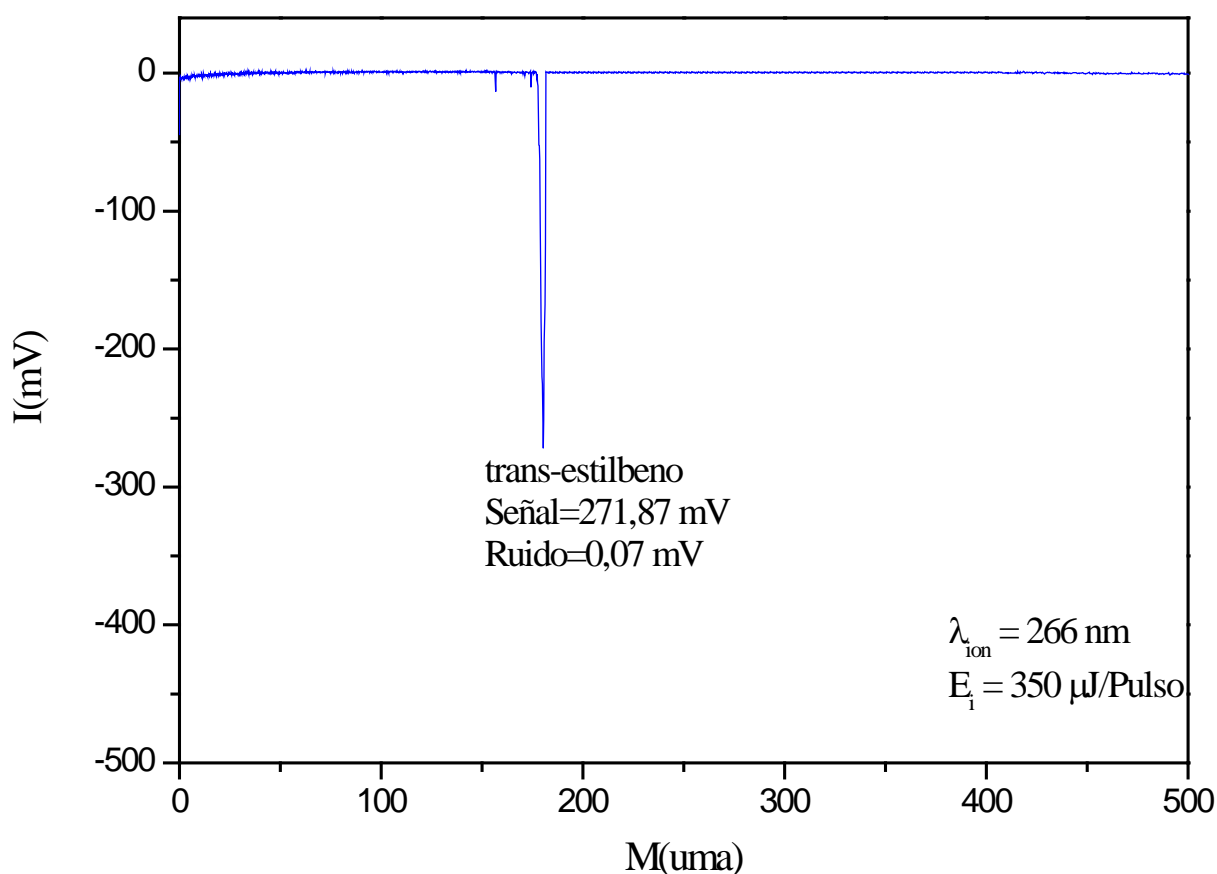


Figura 4.10. Cálculo del límite de detección por la técnica GC-REMPI-TOFMS.

#### **4.2.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.**

El límite de cuantificación es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud. Generalmente se define como la concentración de analito correspondiente al valor del blanco más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media de blancos.

Ninguno de los dos límites representan niveles en los que la cuantificación es imposible; es simplemente una región en que la magnitud de las incertidumbres asociadas es de valor semejante al resultado real. El límite de cuantificación no se debe determinar por extrapolación por debajo del menor estándar analizado.

A partir de la definición se va a calcular como la concentración de trans-estilbeno que posee un cociente señal-ruido  $S/N=10$ . En el espectro correspondiente a la gráfica de la figura 4.12 se obtiene un límite de cuantificación de  $12,8 \frac{\mu g}{L}$ .

#### **4.3. ANÁLISIS DE trans-ESTILBENO EN PIEL DE UVA.**

Una vez caracterizados los procesos para el trans-estilbeno tanto en GC como en la técnica conjunta GC-REMPI-TOF, se procede al análisis de una muestra natural, concretamente uva blanca de la variedad Moscatel adquirida en el mercado. La muestra procede del resultado de la maceración de la piel de uva, previo micropulverizado, en etanol de pureza HPLC durante un periodo aproximado de tres semanas, transcurrido el cual la disolución resultante se filtra con un filtro de tamaño de poro de  $0,3 \mu m$  y esta lista para ser analizada.

##### **4.3.1. ANÁLISIS DE trans-ESTILBENO EN PIEL DE UVA POR GC.**

La muestra procedente de la maceración se filtró sucesivas veces con el fin de eliminar cualquier contaminante que pudiera dificultar el análisis. La introducción de impurezas añadidas a la propia muestra puede redundar en una mala señal, no solo en el primer análisis sino en sucesivos análisis como consecuencia de la obstrucción del puerto de inyección. Este



tipo de muestras biológicas presentan una gran complejidad debido al gran número de compuestos presentes en la misma por lo que el programa de temperatura y las condiciones puestas para su análisis cromatográfico deben de proporcionar un pico que se pueda atribuir de forma unívoca al compuesto de estudio.

Debido a que el etanol empleado en la maceración fue de calidad HPLC, lo que aseguró una pureza de un 99,9%, se garantiza la ausencia de cualquier residuo de agua puesto que la fracción de agua que pudiera contener se ve a su vez disminuida por estar trabajando en condiciones de *split*. Este hecho es muy importante dado que la presencia de agua va dañando la columna de forma gradual en detrimento de una buena señal.

Para este análisis, se configura el sistema para medir solamente con el cromatógrafo de modo que las condiciones experimentales son las que se emplearon para el análisis de trans-estilbeno puro dados en la tabla 4.1. La inyección es de 1  $\mu\text{L}$ , de modo que el cromatograma que se obtiene con estas condiciones se puede observar en la figura 4.11.

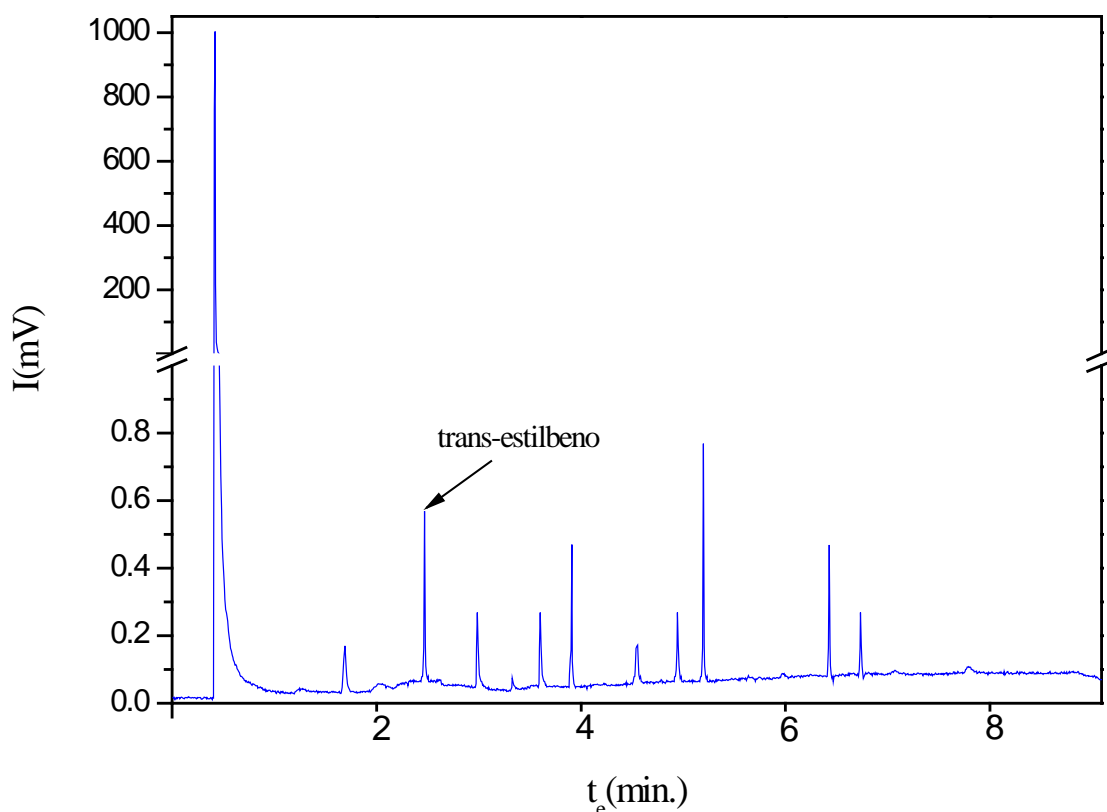


Figura 4.11. Cromatograma obtenido para las condiciones experimentales del trans-estilbeno en la inyección de 1  $\mu\text{L}$  de extracto de uva.

#### **4.3.2. ANÁLISIS DE *trans*-ESTILBENO EN PIEL DE UVA POR GC-REMPI-TOFMS.**

Posteriormente, se realizó la detección del *trans*-estilbeno en la piel de la uva utilizando el acoplamiento de la técnica cromatográfica con la detección por espectrometría láser resonante con el fin de verificar las ventajas de dicho acoplamiento. La muestra procedente de la maceración se filtra sucesivas veces empleando para ello el mismo método que se usó en la preparación de la muestra antes de ser introducida en el cromatógrafo de gases.

Con el puerto FID de detección del GC apagado y el resto de parámetros puestos en las condiciones indicadas en 4.1.2 se procede con la inyección de 1  $\mu$ L de extracto de piel de uva que, tras esperar el tiempo pertinente, proporciona el siguiente espectro de tiempo de vuelo para la molécula de *trans*-estilbeno con un tiempo transcurrido,  $t_i$ , de 4,15 minutos que se muestra en la figura 4.12. La señal de *trans*-estilbeno está presente durante 6,3 segundos; tiempo suficiente para promediar la señal y presentarla en la pantalla del osciloscopio.

Toda columna cromatográfica tiende a perder moléculas de su recubrimiento interno, lo que se conoce como sangrado de la columna. El sangrado de la columna se agudiza si se trabaja con programas de temperatura cercanos a la temperatura máxima operativa de la columna; este hecho provoca que en el tiempo de aparición de la molécula de *trans*-estilbeno se presenten unos picos de pequeña intensidad y duración que con sucesivos promedios se logran caracterizar adecuadamente y por consiguiente, no interfieren en la medida de la molécula de interés.

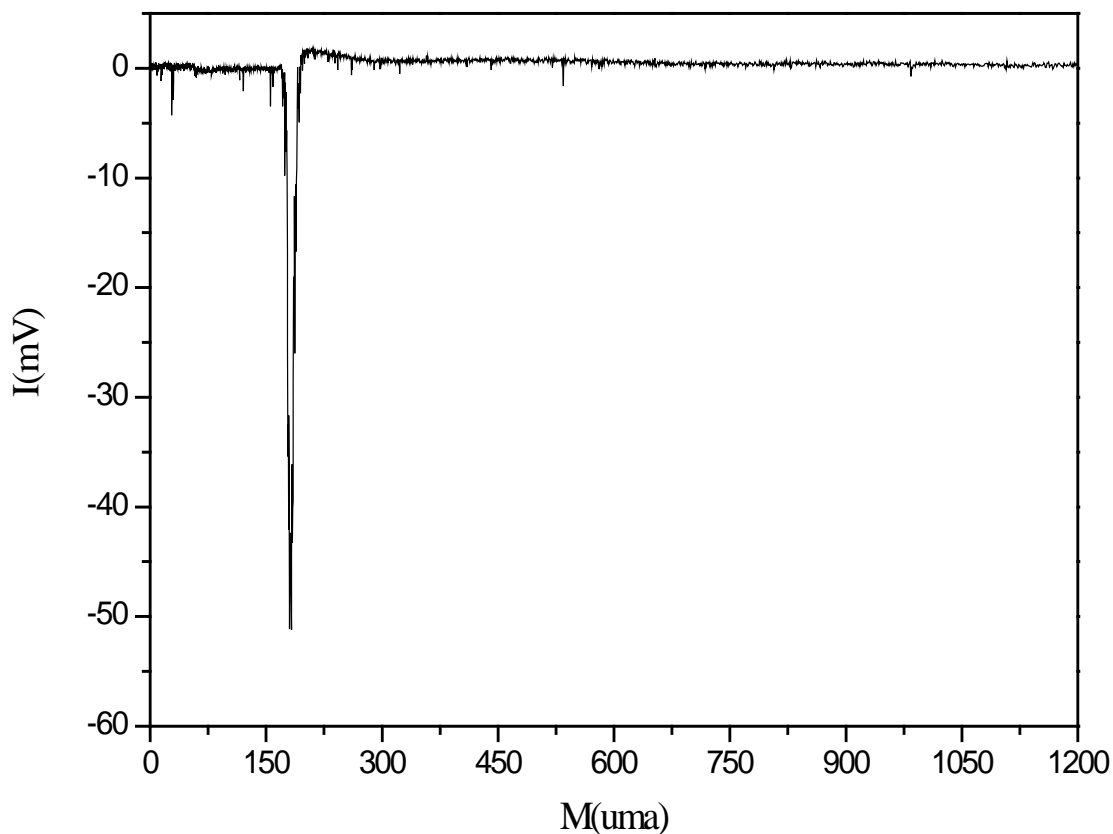


Figura 4.12. *Espectro de masas para  $t_d$  característico del trans-estilbeno procedente de 63 promedios para una muestra natural de piel de uva.*

Con el fin de determinar el contenido de trans-estilbeno en la piel de la uva, se procedió a introducir el valor del área de pico, correspondiente a un espectro en tiempo de vuelo para la figura 4.12, en ordenadas en la recta de calibrado presentada en la figura 4.8 resultando un valor en contenido de trans-estilbeno de 10,48  $\mu\text{g/mL}$ , obtenido de la lectura directa en abscisas, para la piel de uva.

## **5. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

## 5.1. DESARROLLO INSTRUMENTAL Y MEJORA DE LA TÉCNICA LD-REMPI-TOFMS.

La mejora consistente en la incorporación de un sistema de rotación-traslación para proceder con la desorción de la muestra ha dado como resultado un incremento en más del doble de señal con respecto a la situación anterior en la que el vástago permitía sólo la traslación en el eje vertical según se puede apreciar en las gráfica de las figura 5.1.

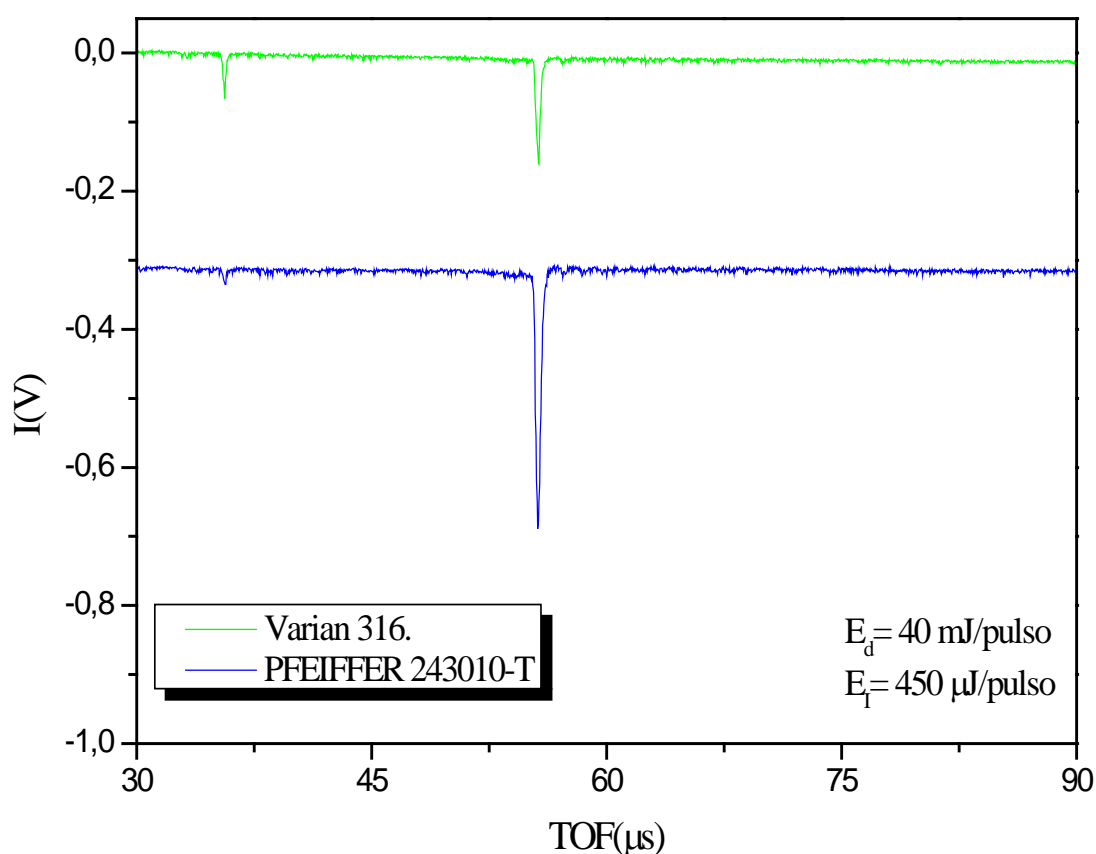


Figura 5.1. Comparación de las desorciones delanteras con diferentes vástagos para una muestra de  $3 \mu g$  de *trans-resveratrol*.

Este hecho pone de manifiesto la fuerte dependencia de la intensidad de señal respecto a la orientación relativa de la muestra con respecto a la dirección del haz láser de desorción.

Los parámetros físicos fundamentales a tener en cuenta para la descripción de un espectro de tiempo de vuelo son la resolución, intensidad y la relación señal/ruido. A continuación se van a calcular estos parámetros para la nueva situación experimental.

### 5.1.1. RESOLUCIÓN.

Se define la resolución instrumental para una señal determinada como el cociente entre  $\Delta m$  y la masa, siendo  $\Delta m$  la anchura de la señal medida a la altura media de la señal. En el caso concreto de medida de tiempo de vuelo puede encontrarse una expresión equivalente para la resolución de nuestro sistema<sup>222-225</sup>.

Las moléculas desorbidas, una vez ionizadas, poseen distinta energía potencial en función de la posición en que se encuentran en el campo eléctrico respecto de las placas aceleradoras. Cuando los iones llegan a la posición  $V_3 = 0$ , según se muestra en la figura 2.3 del apartado experimental de esta tesis, toda la energía potencial se ha transformado en energía cinética, de tal forma que cada ión adquiere una velocidad diferente en función de su masa.

Partiendo de la ecuación:

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 \quad [5.1]$$

donde  $m$  es la masa del ión y  $v$  su velocidad, puede despejarse la masa:

$$m = \frac{2 \cdot E}{v^2} = \frac{2 \cdot E \cdot t^2}{s^2} \quad [5.2]$$

donde  $s$  es la distancia recorrida por el ión. Puede observarse la relación entre  $m$ , la masa del ión y  $t$  su tiempo de llegada al detector. Derivando la expresión 5.2 se llega a una ecuación con el  $\Delta m$  despejado tal que:

$$\Delta m = \frac{4 \cdot t \cdot E \cdot \Delta t}{s^2} \quad [5.3]$$

por lo que nuestra resolución espectral vendrá dada como:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2 \cdot \Delta t} \quad [5.4]$$

$\Delta t$  se define como la anchura de la señal medida a la altura media del pico de tiempo de vuelo, por tanto:

$$R = \frac{t}{2 \cdot (\Delta t)_{FWHM}} \quad [5.5]$$

De la comparación de los espectros obtenidos en las mismas condiciones de energía de desorción y de ionización mostrados en la figura 5.1, se obtiene que la resolución es esencialmente la misma para sendos espectros, resultando ser de  $R \approx 570$ . Considerando que las masas de los analitos en nuestra matriz de desorción se encuentran en el orden de 200 a 400 u.m.a, una resolución de 570 uma es más que suficiente para satisfacer nuestras necesidades analíticas. Por todo ello, la mejora introducida ha dado como resultado un aumento en la intensidad de señal manteniéndose la resolución.

Otro aspecto importante, es el análisis de la relación señal/ruido dado que va a jugar un papel decisivo en la medida del límite de detección. La nueva disposición de la muestra con respecto al haz láser ha permitido también una mejora sustancial en este aspecto, que es ahora aproximadamente tres veces mayor con respecto a la situación anterior.

En la tabla 5.1 se recogen las mejoras obtenidas con la nueva disposición experimental.

<b>Parámetro</b>	<b>Antes</b>	<b>Después</b>
Intensidad (mV)	160,9	377,5
Señal/Ruido	2681,2	7548,3
Resolución	565	570

*Tabla 5.1.- Comparación de las características espectrales en el análisis de la misma cantidad de compuesto con vástagos diferentes.*

## 5.2. ESPECTROSCOPIA MOLECULAR.

### 5.2.1. ANÁLISIS DEL ESPECTRO REMPI OBTENIDO POR LD-REMPI-TOFMS.

Como se indicó anteriormente se ha realizado el estudio espectroscópico REMPI de la molécula de trans-resveratrol con una mayor resolución (0,05 nm) que la que se tenía hasta ahora (0,1 nm) centrándonos únicamente en el intervalo [300,8 nm-303 nm] correspondiente a la banda de mayor intensidad del espectro REMPI obtenido anteriormente (figura 3.3).

La figura 5.2 muestra ambos espectros superpuestos de forma que su comparación resulte más sencilla.

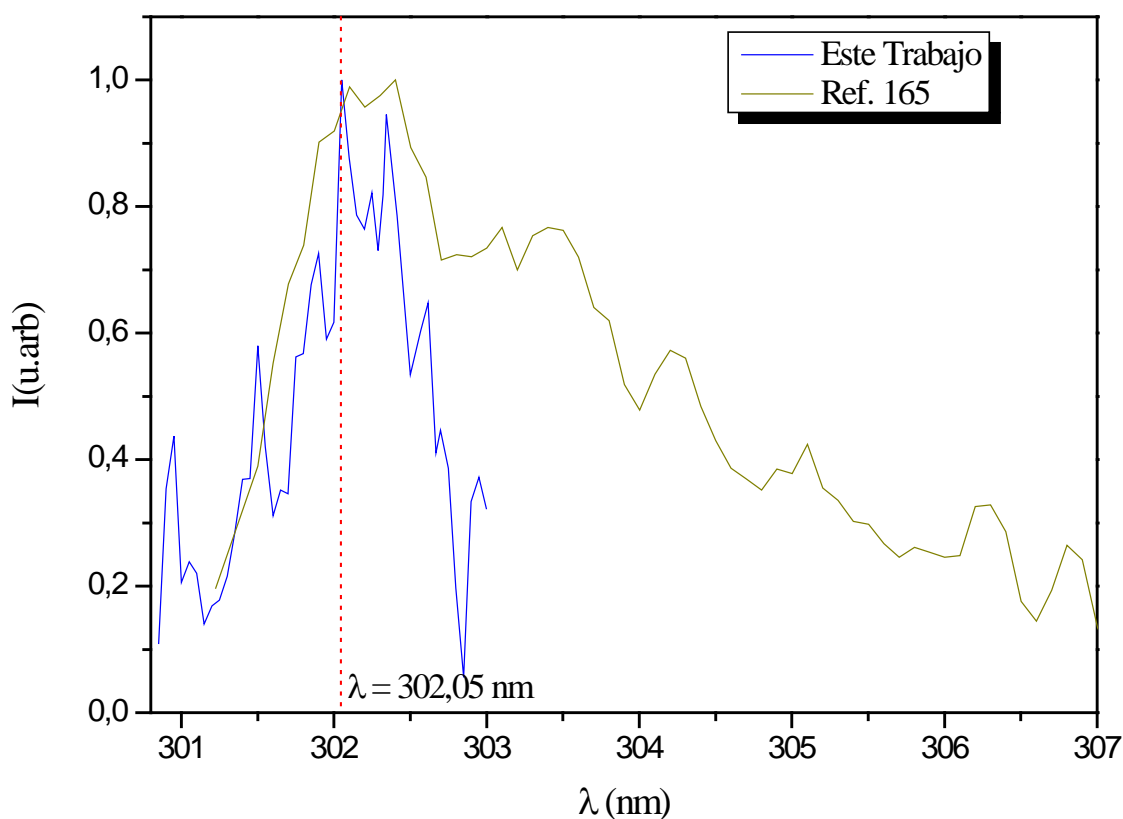


Figura 5.2. Espectros REMPI para la molécula de trans- resveratrol, obtenidos por LD-REMPI-TOFMS para las configuraciones trasera (espectro ref. 165) y delantera (este trabajo).



En la tabla 5.2 se dan las diferencias experimentales en la obtención de ambos espectros para la deposición sobre una placa pyrex de una disolución de 5  $\mu\text{g}$  de trans-resveratrol en 10 mL de etanol.

Proceso	Espectro Ref.165	Este Trabajo
Longitud de onda de desorción	532 nm	1064 nm
Incidencia de la radiación láser de desorción	Trasera	Delantera

Tabla 5.2. *Parámetros experimentales en la obtención del espectro REMPI de la molécula de trans-resveratrol por la técnica LD-REMPI-TOFMS.*

La mayor resolución empleada en la obtención del espectro REMPI, ha permitido trabajar en unas condiciones de mayor precisión y por consiguiente permitió observar una estructura vibro-rotacional presente en dicho intervalo de longitudes de onda. Por otra parte, se ha podido determinar la longitud de onda resonante del trans-resveratrol con mayor precisión, obteniéndose un valor de  $\lambda = 302,05 \pm 0,05$  nm.

No solamente el hecho de trabajar en unas condiciones de mayor resolución ha permitido obtener un espectro mejor resuelto vibro-rotacionalmente sino que las condiciones de desorción empleadas en cada caso han contribuido a las diferencias observadas. Con respecto a las condiciones de desorción empleadas, se encuentra que la densidad fotónica,  $\rho_{1064}$ , cuando se desorbe con la longitud de onda de 1064 nm es el doble que la que incide sobre la placa si la desorción se lleva a cabo con radiación de 532 nm,  $\rho_{532}$ , de acuerdo con la expresión:

$$\frac{E(1064\text{nm})}{E(532\text{nm})} = \frac{\rho_{1064} h \nu_{1064}}{\rho_{532} h \nu_{532}} \quad [5.5]$$

Este hecho, no solamente provoca desorciones más efectivas en el caso de proceder a desorber con la longitud de onda de 1064 nm sino que al llevarse a cabo en una disposición delantera se produce una menor relajación vibro-rotacional por cesión de modos internos a la matriz que rodea a la parte desorbida.

Por consiguiente, el resultado que se deriva de la comparación entre los dos espectros REMPI, no solamente proporciona una valiosa información espectroscópica sobre la molécula de trans-resveratrol sino que demuestra que el proceso de desorción delantera proporciona un haz más activo vibro-rotacionalmente que el generado en la desorción trasera.

### 5.2.2. ANÁLISIS DEL ESPECTRO REMPI OBTENIDO CON LA MÁQUINA DE HACES MOLECULARES.

El proceso físico que subyace en la máquina de Haces Moleculares, tal y como se describió en el apartado 2.3 del sistema experimental, permite la obtención de espectros con una mayor resolución como se muestra en la figura 5.3.

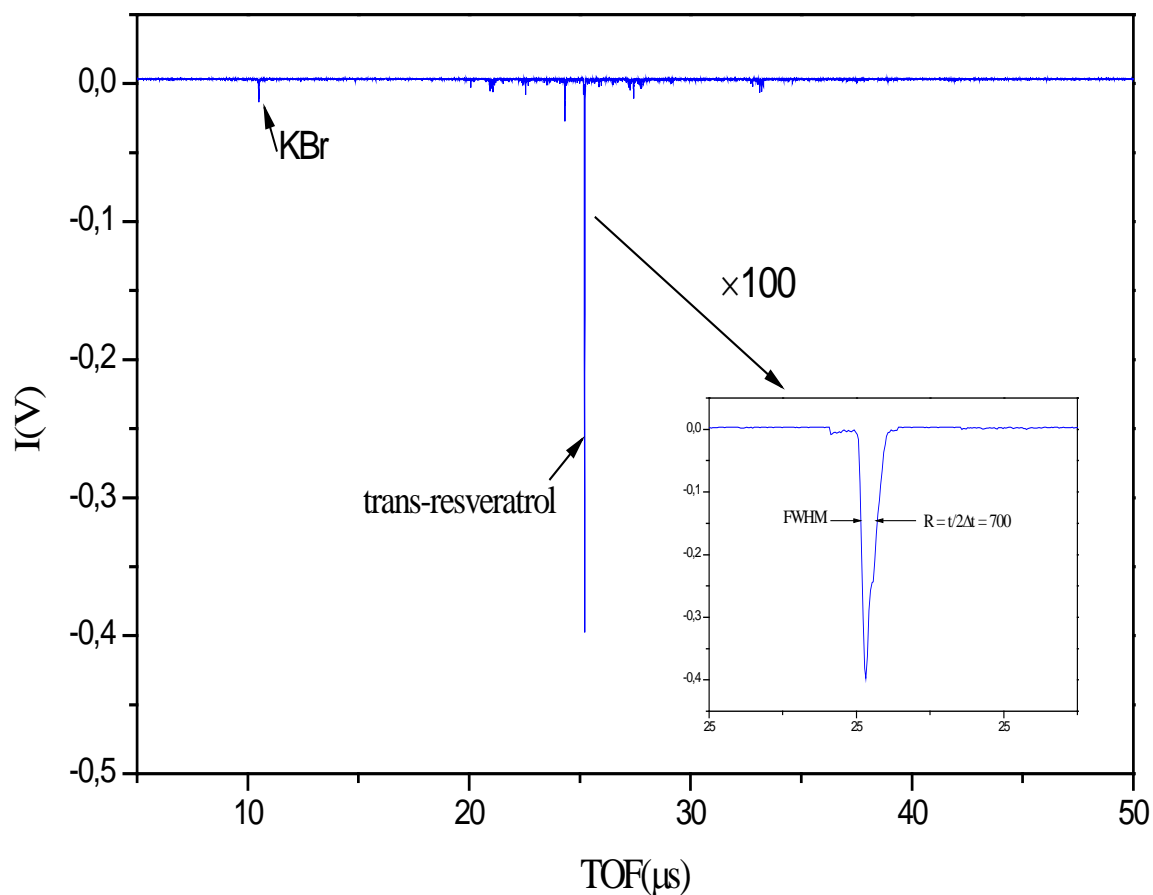


Figura 5.3. Resolución obtenida para la molécula de trans-resveratrol haciendo uso de la técnica de haces moleculares.

En estas mejores condiciones de resolución, como consecuencia de disponer de un haz más frío vibro-rotacionalmente, el espectro REMPI que se obtiene para la molécula de trans-resveratrol permite resolver mejor la estructura vibracional que apareció en el espectro REMPI obtenido por la técnica LD-REMPI-TOFMS y por consiguiente poder asignar de forma más precisa dichas bandas, como se puede apreciar en la figura 5.4.

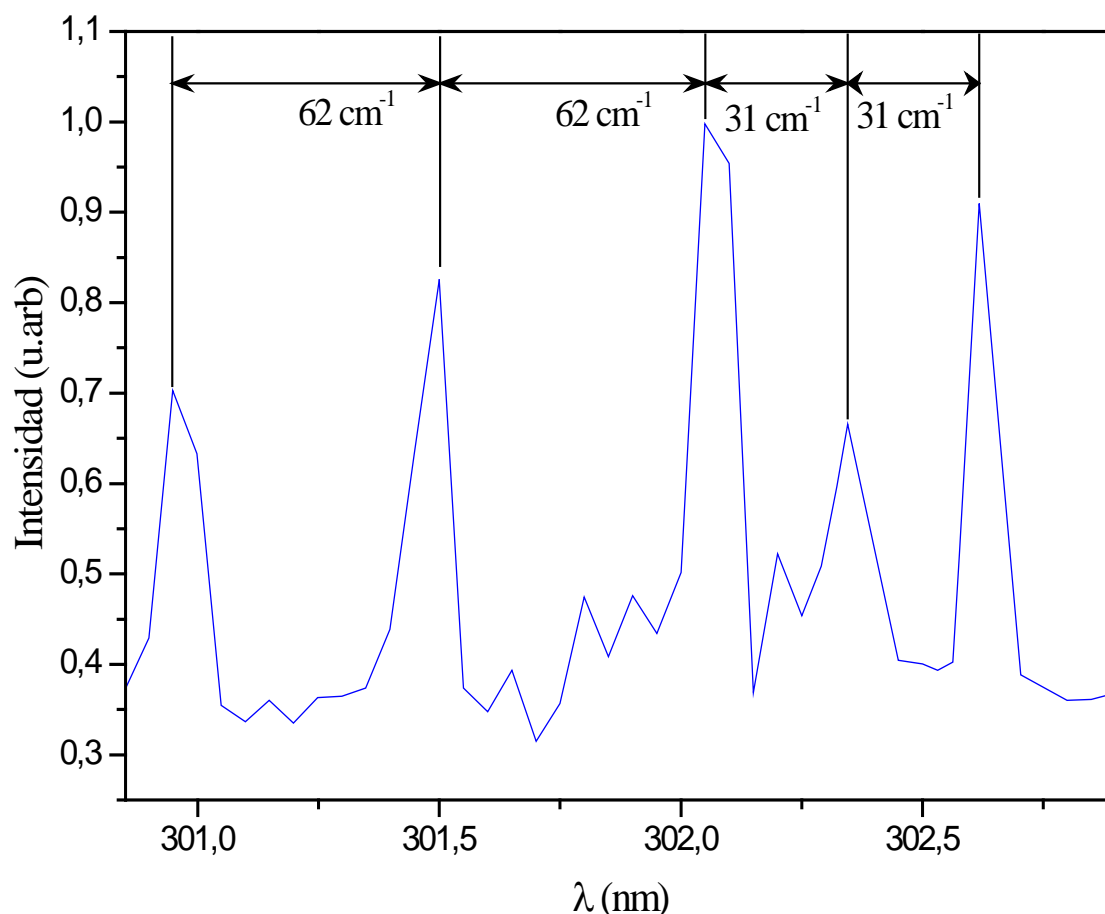


Figura 5.4. Espectro REMPI para la molécula de trans-resveratrol del intervalo 300,8-302,3 nm obtenido por medio de la máquina de haces moleculares.

En la figura 5.4 se pueden observar dos claros espaciados de  $62\text{ cm}^{-1}$  y de  $31\text{ cm}^{-1}$ , aunque este último se presenta en una sola banda dentro del intervalo de estudio por lo que esta tesis se centrará principalmente en el espaciado de  $62\text{ cm}^{-1}$ . El espaciado de  $31\text{ cm}^{-1}$  se puede corresponder con la torsión alrededor del doble enlace para los grupos fenilo<sup>227</sup>, de forma análoga a lo observado en la molécula de trans-estilbeno. Estos aspectos se van a discutir con posterioridad.

### **5.2.3 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LAS BANDAS EN EL ESTADO TORSIONAL DEL *trans*-RESVERATROL.**

El análisis comparativo en la región del REMPI correspondiente al intervalo de longitudes de onda [300,8 nm -303 nm] de máxima absorción para la molécula de *trans*-resveratrol ha permitido identificar un intervalo de separación, que a partir de la comparación con una molécula de características similares, *trans*-estilbeno, ha permitido asignar las bandas de dicho intervalo con un movimiento característico propio de la molécula de *trans*-resveratrol.

#### **5.2.3.1. ESPACIADO EN EL ESPECTRO REMPI DE LA MOLÉCULA DE TRANS-RESVERATROL.**

En la figura 5.5 se puede observar los espectros comparados para el intervalo de longitudes de onda [300,8 nm-303 nm] para la molécula de *trans*-resveratrol obtenido a partir de las dos técnicas comentadas anteriormente.

La fluencia láser empleada en la adquisición de ambos espectros fue la misma, y se controló intercalando un iris de apertura conocida a la entrada previa del láser a la cámara de ionización. En ambos casos la intensidad de señal está normalizada con el cuadrado de la energía láser recogida en cada momento del experimento con un detector piroeléctrico dado que el proceso presenta una absorción bifotónica, derivado de la pendiente de la presentación doble logarítmica de la intensidad frente al número de fotones absorbido.

Es menester señalar que tal y como se indicó anteriormente el espectro obtenido en las mismas condiciones de fluencia mediante el empleo de cada una de las técnicas, presenta unas marcadas diferencias en lo que a su resolución se refiere. Mostrando el espectro obtenido por medio de la máquina de Haces Moleculares una mayor resolución espectroscópica.

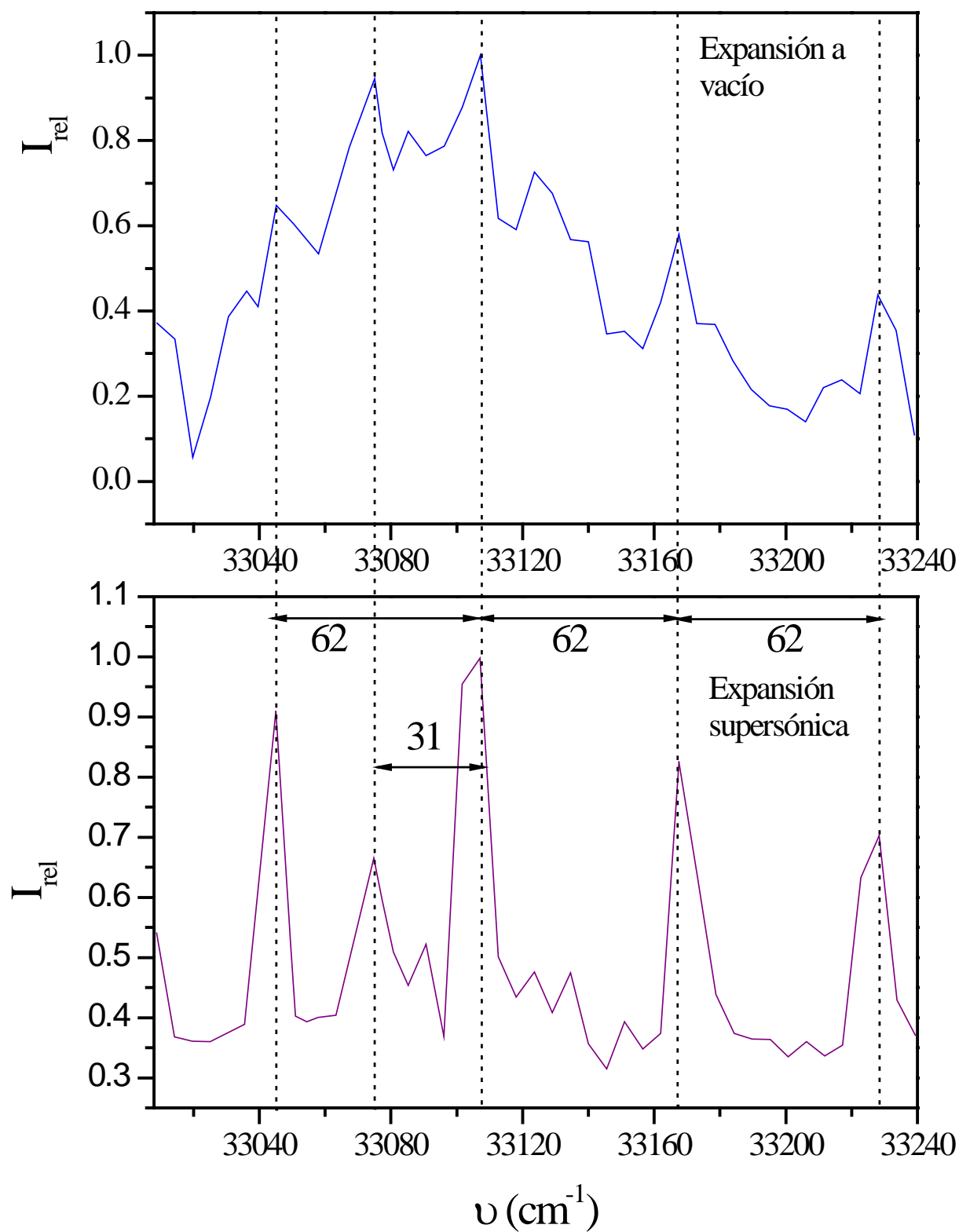
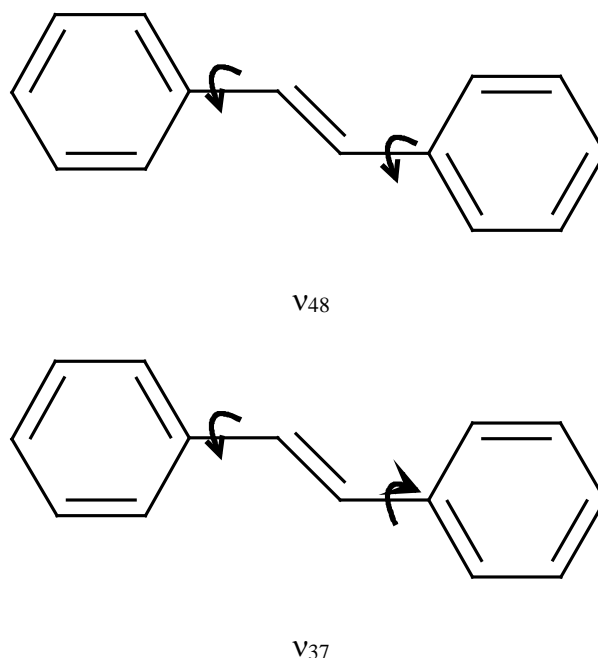


Figura 5.5. Comparación de las bandas de la molécula de trans-resveratrol obtenida con las diferentes técnicas LD-REMPI-TOFMS (superior) y Máquina de Haces Moleculares (inferior).

El hecho de no existir un estudio completo en el momento de escribir esta memoria sobre la molécula de trans-resveratrol ha dado como resultado que la comparación y la consiguiente asignación se tengan que hacer en base a una molécula mucho mejor documentada y de estructura similar a la del trans-resveratrol. La molécula que cumple con ambos requisitos, es la molécula de trans-estilbeno con un sistema de electrones  $\pi$  conjugado con anillos aromáticos y grupo vinilo insaturado cuya estructura se presentó en la figura 3.8 del apartado de resultados de esta tesis. Su gran similitud con respecto a la molécula de trans-resveratrol, exceptuando los grupos OH, ha permitido dar una asignación vibracional al espaciado obtenido en el espectro de trans-resveratrol. Análogamente a como ocurre en el caso de trans-resveratrol, el trans-estilbeno presenta dos formas isoméricas cis y trans, siendo el que interesa el isómero trans.

Concretamente los resultados de la fluorescencia para la molécula de trans-estilbeno<sup>227</sup> asignan un valor de  $70\text{ cm}^{-1}$  para el tránsito (0,0)-(4,0) en el estado excitado, al movimiento de torsión del fenilo en torno al doble enlace asignado a las frecuencias  $\nu_{37}$ ,  $\nu_{48}$ , respectivamente tal y como se muestra en la figura 5.6.



*Fig 5.6. Frecuencia de torsión del grupo fenilo en torno al doble enlace del grupo vinilo.*

En la tabla 5.6, se puede observar una comparación entre la asignación realizada para la molécula de trans-estilbeno en el estado excitado y la obtenida experimentalmente para la molécula de trans-resveratrol.

<b>ESPACIADO (0,0)-(v<sub>37</sub>,v<sub>48</sub>)</b>	<b>S1<sup>227</sup> trans-estilbeno</b>	<b>S1(Este Trabajo) trans-resveratrol</b>
(0,0)-(2,0)	35	31
(0,0)-(4,0)	70	62
(0,0)-(6,0)	.....	93
(0,0)-(8,0)	142	124
(0,0)-(12,0)	.....	186

*Tabla 5.3. Comparación de los espaciados vibracionales entre las moléculas de trans-estilbeno y trans-resveratrol.*

De la comparación entre los resultados obtenidos para el espaciado de la molécula de trans-estilbeno y trans-resveratrol se desprende que se trata de un movimiento umbral en el estado excitado por lo que su estudio se podrá hacer en base a la mecánica clásica como se verá en los siguientes apartados.

Con el fin de asignar el espaciado a un movimiento concreto para la molécula de trans-resveratrol a partir de un movimiento conocido de la molécula de trans-estilbeno, se han de disponer de datos precisos de las vibraciones de ambas moléculas obtenidos a partir de sus respectivos espectros de infrarrojo por la técnica de FTIR.

### 5.2.3.2 CARACTERIZACIÓN POR TEORÍA DE GRUPOS DE LA MOLÉCULA DE trans-RESVERATROL.

Como primera aproximación de identificación de los modos posibles de vibración presentes en una molécula de trans-resveratrol se va a hacer uso de la teoría de grupos dado que en el estado fundamental los análisis por rayos X muestran que la molécula es esencialmente

plana<sup>228</sup>, si bien no se disponen de datos de difracción de electrones en fase gaseosa lo que podría dar más luz sobre la estructura real de la molécula de trans-resveratrol. No obstante, a temperaturas lo suficientemente bajas en comparación con los resultados obtenidos para la molécula de trans-estilbeno<sup>229</sup> se puede asegurar la planaridad de la molécula de trans-resveratrol.

Una vez establecida la estructura plana de la molécula de trans-resveratrol, los elementos de simetría que se identifican para dicha molécula son la operación de identidad y un plano de simetría horizontal, se puede catalogar a la molécula de trans-resveratrol como perteneciente al grupo puntual  $C_s$ <sup>230</sup>. La tabla de caracteres para dicho grupo puntual es la siguiente:

<b>Cs</b>	<b>E</b>	<b><math>\sigma</math></b>	<b>h= 2</b>	
<b>A'</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>x, y, <math>R_z</math></b>	<b>xx, yy,zz, xy</b>
<b>A''</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>z, <math>R_x, R_y</math></b>	<b>yz, xz</b>

Tabla 5.4. *Tabla de caracteres del grupo puntual  $C_s$ .*

Como el número de átomos presentes en la molécula de resveratrol es de 29, se puede llegar a la siguiente representación irreducible.

<b>Operación de simetría</b>	<b>E</b>	<b><math>\sigma</math></b>
Nº de átomos sin cambio	29	29
Contribución al carácter por átomo	3	1
$\Gamma_{mol}$	87	29

Tabla 5.5. *Representación irreducible para la molécula de trans-resveratrol.*

Si se hace uso de la fórmula de reducción:

$$n = \frac{1}{h} \sum N \chi_R \chi_I \quad [5.6]$$



Se obtiene, el número de veces que cada una de las representaciones irreducibles ocurre:

$$n(A') = \frac{1}{2} [87 \times 1 \times 1 + 29 \times 1 \times 1] = 58$$

$$n(A'') = \frac{1}{2} [87 \times 1 \times 1 - 29 \times 1 \times 1] = 29$$

$$\Gamma_{\text{mol}} = 58 A' + 29 A''$$

De la tabla 5.4, se obtienen las siguientes simetrías para las rotaciones y translaciones:

$$\Gamma_{\text{rot}} = A' + 2 A''$$

$$\Gamma_{\text{trans}} = 2 A' + A''$$

Así pues, la molécula de trans-resveratrol puede presentar los siguientes modos vibracionales:

$$\Gamma_{\text{vibr}} = \Gamma_{\text{mol}} - \Gamma_{\text{trans}} - \Gamma_{\text{rot}} \Rightarrow \Gamma_{\text{vibr}} = 55 A' + 26 A''$$

De este primer análisis derivado de la teoría de grupos y simetría, se desprende que no se podrá discriminar ninguna banda haciendo uso simultáneo de la espectroscopia infrarroja y de la espectroscopia Raman. Por ello, para obtener las bandas de vibración se obtuvo el espectro de IR haciendo uso de un FTIR.

Es bien sabido, que las fuertes asociaciones por puente de hidrógeno de H-O...H se aprecian de forma muy débil en IR por lo que resultaría conveniente acudir al espectro Raman<sup>231</sup>. Sin embargo, este tipo de asociaciones no parecen corresponderse con el movimiento observado en la molécula de trans-resveratrol.

### 5.2.3. ESTUDIO DEL ESPECTRO DE IR DE LAS MOLÉCULAS DE *trans*-ESTILBENO Y *trans*-RESVERATROL.

#### 5.2.3.1. ESTUDIO DEL ESPECTRO DE IR DE LA MOLÉCULA DE *trans*-ESTILBENO.

En las siguientes gráficas, se presenta la asignación para las distintas bandas en el espectro original de *trans*-estilbeno<sup>a</sup> obtenido por FTIR de modo que en la primera gráfica se observa una asignación de conjunto y las siguientes presentan una asignación detallada en zonas concretas y características de las vibraciones presentes en una molécula tal como el *trans*-estilbeno.

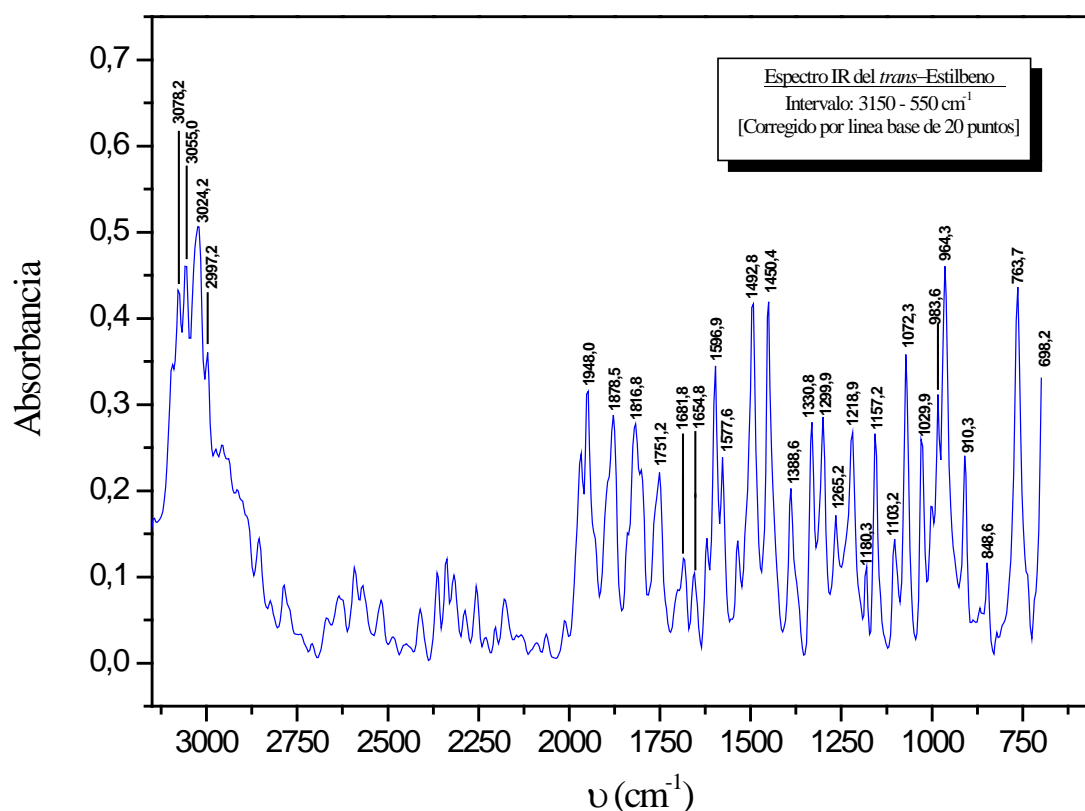


Figura 5.7. Espectro IR del *trans*-estilbeno 3150-550  $\text{cm}^{-1}$  corregido por línea base de 20 puntos.

<sup>a</sup> Se agradece al profesor titular Manuel Gil Criado, del Departamento de Química-Física de la facultad de CC. Químicas de la UCM, la asignación realizada para la molécula de *trans*-estilbeno, así como la de la molécula de *trans*-resveratrol que se muestra en el siguiente apartado.

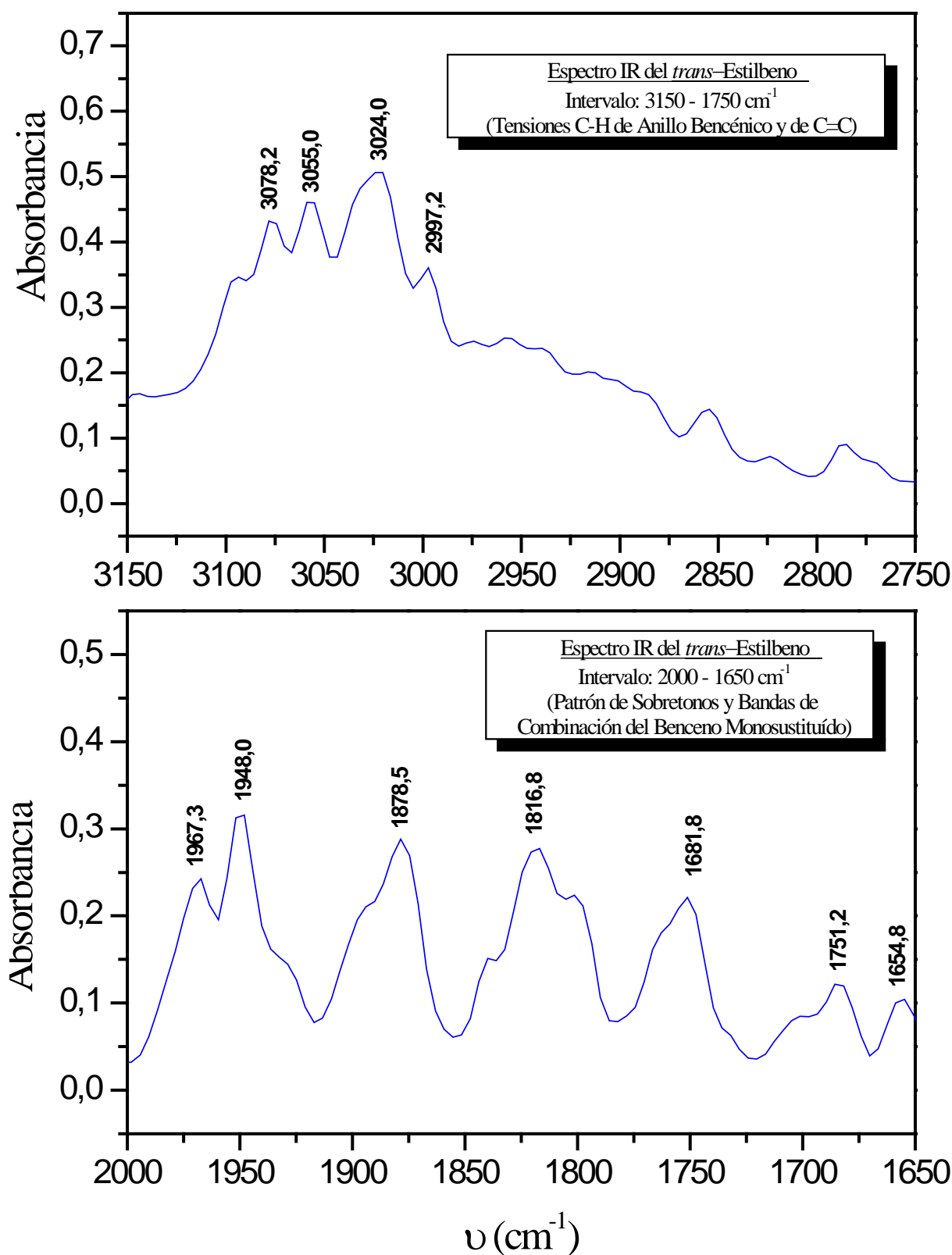


Figura 5.8. Superior: Espectro IR del *trans*-estilbeno 3150-2750  $\text{cm}^{-1}$ . Tensiones C-H de anillo bencénico y de C=C. Inferior: Espectro IR del *trans*-estilbeno 2000-1650  $\text{cm}^{-1}$ . Patrón de sobretonos y bandas de combinación del benceno monosustituído.

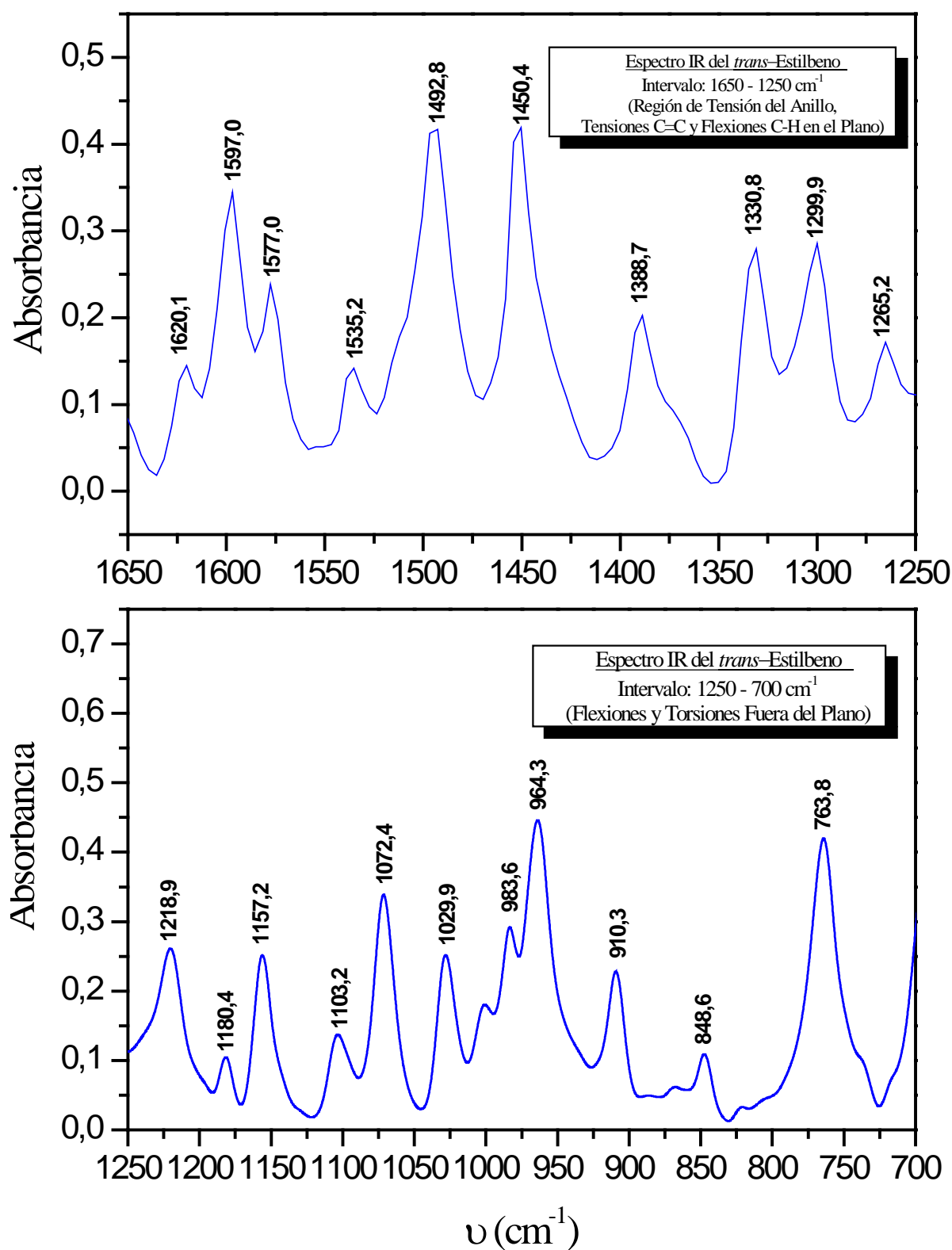


Figura 5.9. Superior: Espectro IR del *trans*-estilbena 1650-1250  $\text{cm}^{-1}$ . Región de tensión del anillo, tensiones C=C y flexiones C-H en el plano. Inferior: Espectro IR del *trans*-estilbena 1250-700  $\text{cm}^{-1}$ . Flexiones y torsiones fuera del plano.

Con el fin de asegurar que el espectro obtenido es el correspondiente al trans-estilbeno, y no ha habido isomerización a cis así como que el producto comercial estaba en óptimas condiciones, en la tabla 5.5 se hace una comparación con una tabla de datos bibliográfica<sup>232</sup>.

Nº Banda	trans-estilbeno (Experimentales)	trans-estilbeno “ACP-512”	cis-estilbeno “ACP-513”
1	3078,2	3076,4	3074,41
2	3055,0	3055,04	3055,02
3	3024,2	3021,13	3018,84
4	1948,0	1949,33	1951,09
5	1878,5	1878,17	1989,16
6	1816,8	1816,65	1807,39
7	1751,2	1751,08	1753,01
8	1681,8	1681,65	1694,19
9	1654,8	-----	-----
10	1620,1	-----	-----
11	1597,0	1596,03	1599,33
12	1577,0	1575,58	1574,55
13	1535,2	-----	1541,51
14	1492,8	1492,49	1492,38
15	1450,4	1456,33	1455,90
16	-----	-----	1405,78
17	1388,7	1376,56	-----
18	1330,8	1335,49	1326,81
19	1299,9	1301,91	-----
20	1265,2	1268,95	-----
21	1218,9	1220,47	1238,45
22	1180,4	1184,10	1180,50
23	1157,2	1155,02	1154,35
24	1103,2	1101,82	1099,45
25	1072,4	1070,96	1073,33
26	1029,9	1026,11	1027,43
27	983,6	985,32	-----
28	964,3	963,26	964,15
29	910,3	908,77	923,45
30	867,9	-----	860,97
31	848,6	849,31	-----
32	763,8	764,05	778,85
33	-----	725,12	731,85
34	-----	692,33	697,46
35	-----	528,51	559,97
36	-----	-----	502,23
37	-----	468,90	-----
38	-----	-----	452,11
39	-----	-----	-----
40	-----	-----	-----

Tabla 5.6. Comparación de los valores experimentales de las frecuencias de vibración del trans- estilbeno con los valores bibliograficos para el trans-estilbeno y cis- estilbeno.

La comparación de los datos de la tabla 5.5 permite asegurar que el espectro de trans-estilbeno obtenido coincide muy bien con los datos bibliográficos y permite descartar la existencia en la muestra de cis-estilbeno. A pesar de no poseer datos por debajo de  $760\text{ cm}^{-1}$ , los datos relevantes que descartan la existencia de cis-estilbeno son las bandas aproximadamente a  $1300$ ,  $1265$  y  $985\text{ cm}^{-1}$  que se observan tanto en las moléculas de trans-estilbeno como trans-resveratrol y no lo hacen en el espectro de cis-estilbeno.

#### 5.2.3.2. ESTUDIO DEL ESPECTRO DE IR DE LA MOLÉCULA DE trans-RESVERATROL.

Análogamente al caso del trans-estilbeno, se han asignado las bandas obtenidas por FTIR para la molécula de trans-resveratrol. Se descartó la presencia del isómero cis haciendo uso de la técnica LD-REMPI-TOFMS en donde se sabe que una cantidad patrón de trans-resveratrol puro da una intensidad de señal perfectamente conocida, además se efectuó un espectro en la región de absorción característica de ambos isómeros por medio de un espectrofotómetro de absorción, viéndose descartada por ambas vías la presencia del isómero cis en la muestra.

El espectro de FTIR para el compuesto de trans-resveratrol obtenido en las mismas condiciones de resolución que para el compuesto de trans-estilbeno se presenta en la parte superior de la figura 5.10 para a continuación, de forma análoga al caso del trans-estilbeno, presentar una asignación por regiones con el fin de tener completamente caracterizadas las bandas que aparecen en dicho compuesto.

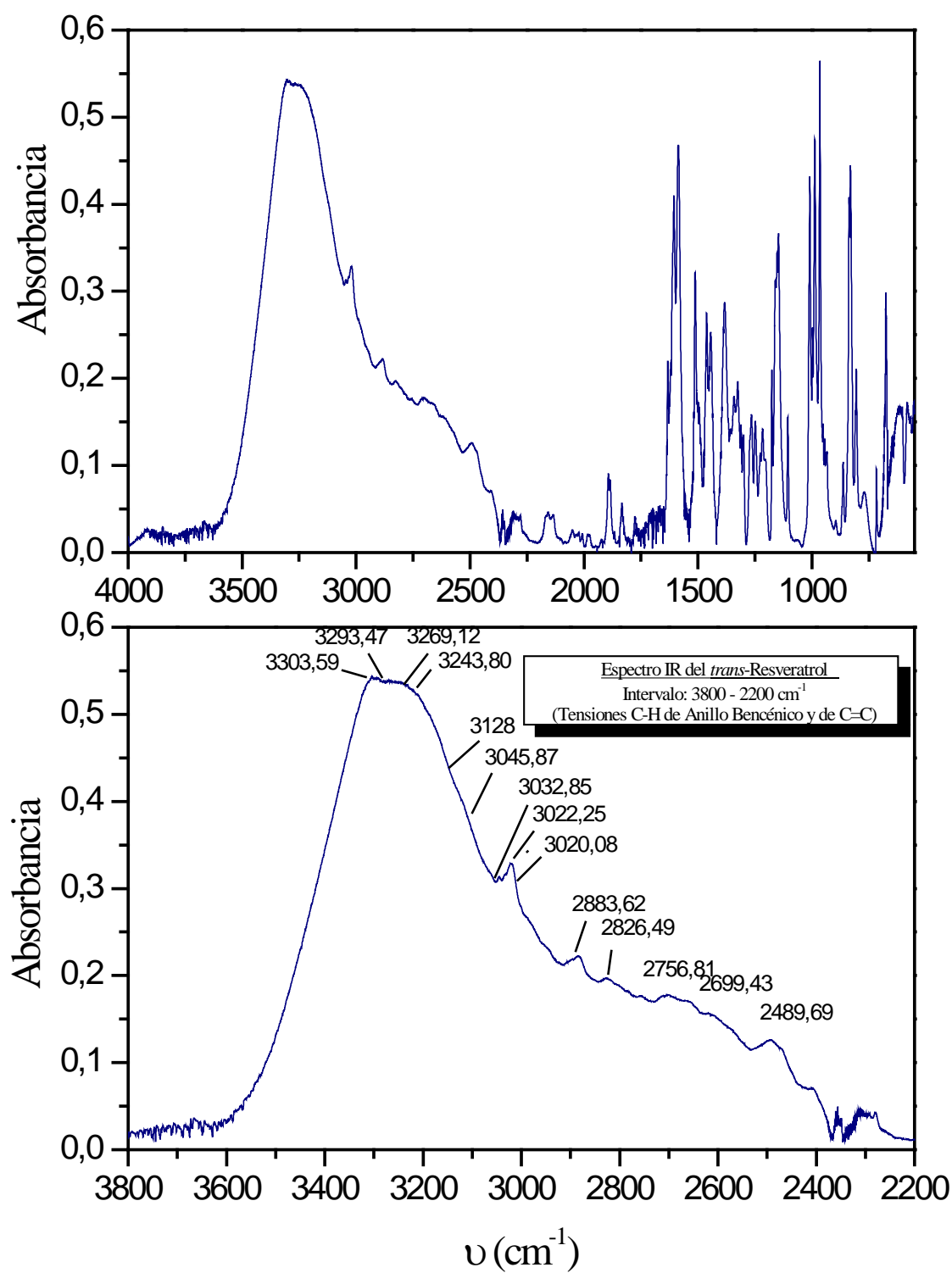


Figura 5.10. Superior: Espectro IR del *trans*-resveratrol 4000-450  $\text{cm}^{-1}$ , corregido el fondo por línea base. Inferior: Espectro IR del *trans*-resveratrol 3800-2200  $\text{cm}^{-1}$  tensiones C-H de anillo bencénico y de C=C, corregido el fondo por línea base.

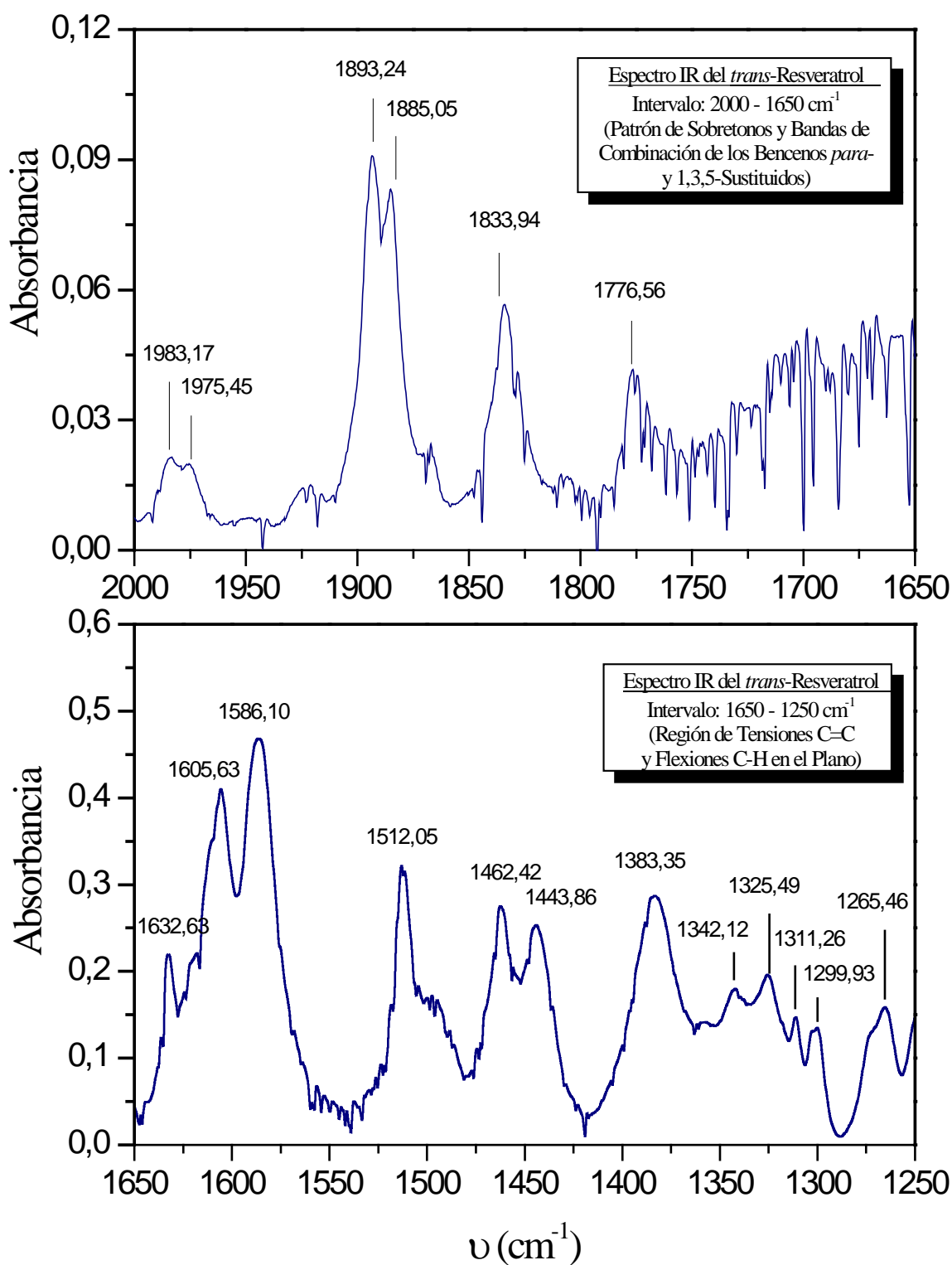


Figura 5.11. Superior: Espectro IR del *trans*-resveratrol 2000-1650  $\text{cm}^{-1}$ : patrón de sobretonos y bandas de combinación de los benceno *para* y 1,3,5- sustituídos. Inferior: Espectro IR del *t*-Resveratrol 1650-1250  $\text{cm}^{-1}$ : región tensiones C=C y flexiones C-H en el plano.



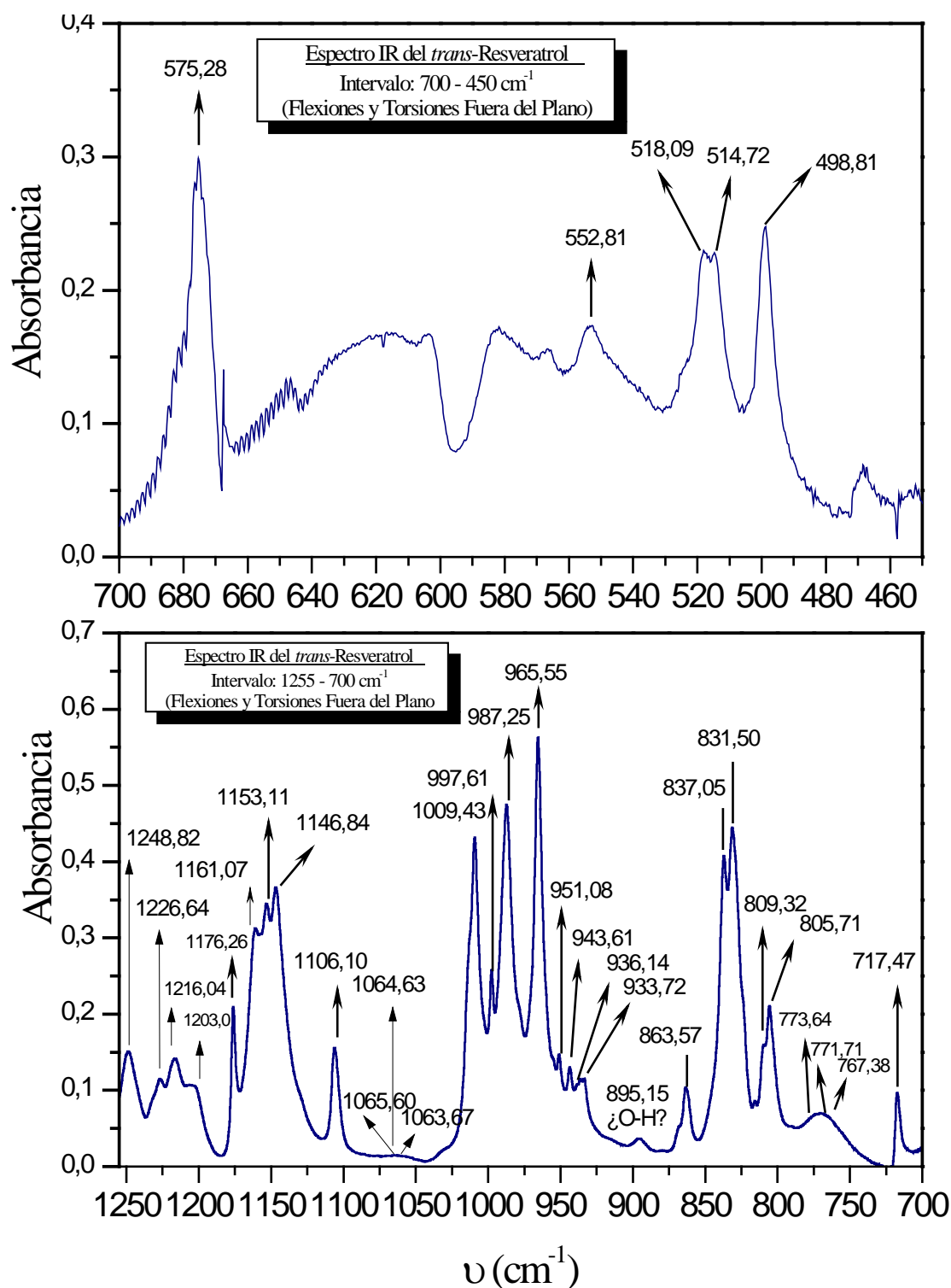


Figura 5.12. Superior: Espectro IR del *trans*-resveratrol 700-450  $\text{cm}^{-1}$ : flexiones y torsiones fuera del plano. Inferior: Espectro IR del *trans*-resveratrol 1255-700  $\text{cm}^{-1}$ : flexiones y torsiones fuera del plano.

En la tabla 5.7 se muestran las posiciones espectrales para los espectros IR de trans-resveratrol comparadas con las frecuencias medidas para el espectro IR de trans-estilbeno.

Banda	trans- resveratrol	trans- estilbeno	Banda	trans- resveratrol	trans- estilbeno
1	3303,6	-----	30	1226,6	-----
2	3293,5	-----	31	1216,0	1218,9
3	~3243	-----	32	1203,0	-----
4	~3100	3078,2	33	1176,3	1180,4
5	3045,9	3055,0	34	1161,1	1157,2
6	3022,3	3024,2	35	1153,1	-----
7	-----	1948,0	36	1146,8	-----
8	1893,2	-----	37	1106,1	1103,2
9	1885,1	1878,5	38	1065,6	1072,4
10	1833,9	1816,8	39	1009,4	1029,9
11	1776,6	1751,2	40	997,6	-----
12	-----	1681,8	41	987,3	983,6
13	1632,6	1654,8	42	965,6	964,3
14	-----	1620,1	43	951,1	-----
15	1605,6	1597,0	44	943,6	-----
16	1586,1	1577,0	45	933,7	910,3
17	-----	1535,2	46	-----	-----
18	1512,1	1492,8	47	863,6	867,9
19	1462,4	-----	48	837,1	848,6
20	1443,9	1450,4	49	831,5	-----
23	1383,4	1388,7	50	809,3	-----
24	1342,1	-----	51	805,7	-----
25	1325,5	1330,8	52	773,6	763,8
26	1311,3	-----	53	771,7	-----
27	1299,9	1299,9	54	717,5	-----
28	1265,5	1265,2			
29	1248,8	-----			

Tabla 5.7. Comparación de posiciones, en  $\text{cm}^{-1}$ , medidas en espectros IR de trans-resveratrol y trans-estilbeno.

Al ser de una gran complejidad el espectro de vibración de la molécula de trans-resveratrol, como se preveía por los datos de teoría de grupos y se pone de manifiesto en el espectro de infrarrojo, la búsqueda de un espaciado correspondiente a una vibración exclusiva

en el mismo haciendo uso del espectro de IR da como resultado que muchas de ellas se vean enmascaradas por otras de mayor intensidad.

Como se está comparando un movimiento torsional en diferentes moléculas, se va a hacer uso de la masa reducida de ambas moléculas correspondientes al mismo movimiento de torsión tal como se muestra en la figura 5.13.

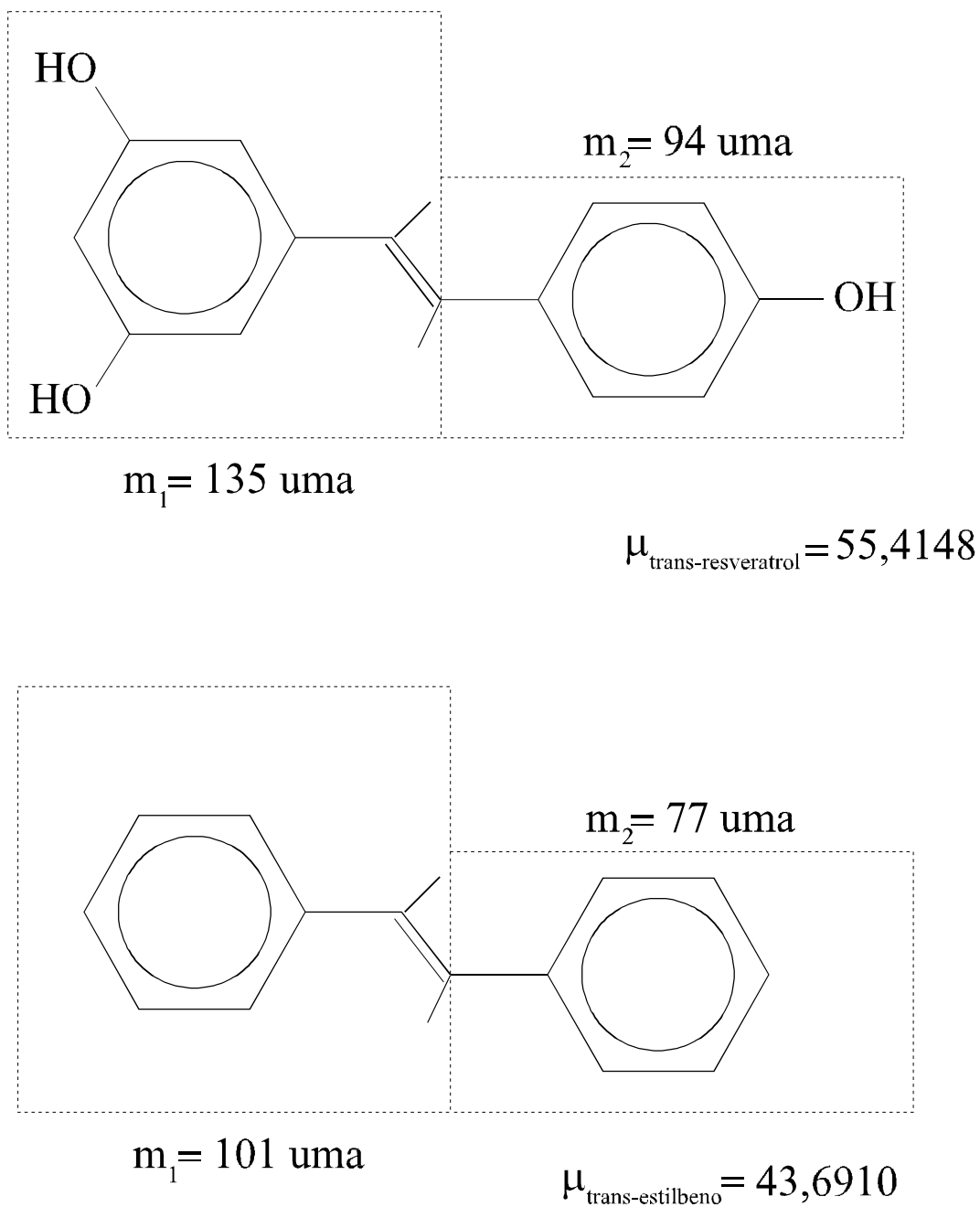


Figura 5.13. Masas reducidas del trans-resveratrol y trans-estilbeno en el modo torsional en torno al fenilo.

Una de las características fundamentales de una vibración es que da una magnitud de la fuerza de enlace entre los átomos involucrados en dicha vibración, por ello a partir de los espectros caracterizados de las moléculas de trans-estilbeno y trans-resveratrol se han calculado el cociente entre las fuerzas de enlace en las que intervienen enlaces y átomos de la misma naturaleza. Alguno de esos cocientes se muestran en la tabla 5.8.

Tipo de Enlace	$K_{\text{trans-resveratrol}} / K_{\text{trans-estilbeno}}$
$(\text{C}=\text{C})_{\text{Vinilo}}$	1,00061
$(\text{C}-\text{H})_{\text{Fenilo}}$	1,00027

Tabla 5.8. Comparación de algunas fuerzas de enlace entre las moléculas de trans-estilbeno y trans-resveratrol.

De los resultados de la comparación de las fuerzas de enlace se desprende que en los cálculos se puede suponer como muy buena aproximación que se mantiene un mismo orden de magnitud en lo referente a fuerza de enlace para mismas regiones en ambas moléculas y por consiguiente se puede asignar la frecuencia que le correspondería al movimiento de torsión en torno al fenilo al caso de la molécula de trans-resveratrol tal y como se muestra a continuación.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad [5.7]$$

$$\mu_{\text{trans-estilbeno}} = 44,06 \text{ uma}$$

$$\mu_{\text{trans-resveratrol}} = 55,06 \text{ uma}$$

Así pues, se pueden relacionar las frecuencias calculadas para la torsión en torno al fenilo en el caso de la molécula de trans-estilbeno con la correspondiente a la molécula de trans-resveratrol a partir de la expresión 5.8.

$$\frac{\nu_{t-\text{estilbeno}}^2}{\nu_{t-\text{resveratrol}}^2} = \frac{\mu_{t-\text{resveratrol}}}{\mu_{t-\text{estilbeno}}} \quad [5.8]$$

En siguiente tabla se expone la comparación entre los valores encontrados por diferentes autores como su correspondiente valor para el trans-resveratrol por el empleo de la expresión 5.8.

$(\tau_{CC})_{\text{trans-estilbeno}}$	$(\tau_{CC})_{\text{trans-resveratrol}}$
$70^{227}$	62,61
$60^{231}$	53,67

Tabla 5.9. *Correspondencia de las frecuencias de torsión entre los valores experimentales obtenidos para la molécula de trans-estilbeno y su valor para la molécula de trans-resveratrol.*

Dado que el estudio se está realizando en los niveles fundamentales del estado excitado y, por consiguiente, los efectos de distorsión centrífuga y salida de la anarmonicidad en la curva de energía potencial se pueden despreciar, se puede concluir que el espaciado obtenido para la molécula de trans-resveratrol se corresponde a un movimiento de torsión en torno al fenilo. Resultando estar en una mayor concordancia con el valor correspondiente a  $70 \text{ cm}^{-1}$  para la molécula de trans-estilbeno.

Dicho movimiento debe situarse al inicio de la curva de energía potencial y por consiguiente es un movimiento umbral de la isomerización trans-resveratrol  $\rightarrow$  cis-resveratrol.

### 5.3. APLICACIONES ANALÍTICAS.

#### 5.3.1. ANÁLISIS DEL TRANS-RESVERATROL EN MUESTRAS NATURALES POR LD-REMPI-TOFMS.

Una de las características básicas de la técnica LD-REMPI-TOFMS es su gran selectividad a la hora de analizar cualquier compuesto dentro de una matriz compleja una vez caracterizado su espectro REMPI de absorción como es el caso del trans-resveratrol.

Las distintas resoluciones obtenidas en el análisis de compuestos de interés dentro de las distintas matrices van a encontrarse dentro del intervalo que satisface nuestras necesidades analíticas; el hecho de que cada matriz en particular presente un conglomerado de distintas moléculas provoca que el enfriamiento sea tanto mayor si la matriz la componen moléculas con pocos grados de libertad, lográndose una mayor velocidad de expansión del material desorbido y por consiguiente una mejor resolución<sup>184</sup>. En la figura 5.13 se muestra una comparación entre las distintas resoluciones según la matriz a analizar de modo que se puede concluir que los elementos y sustancias que componen la matriz de la bistorta dan como resultado la obtención de una mayor resolución en el espectro de tiempo de vuelo.

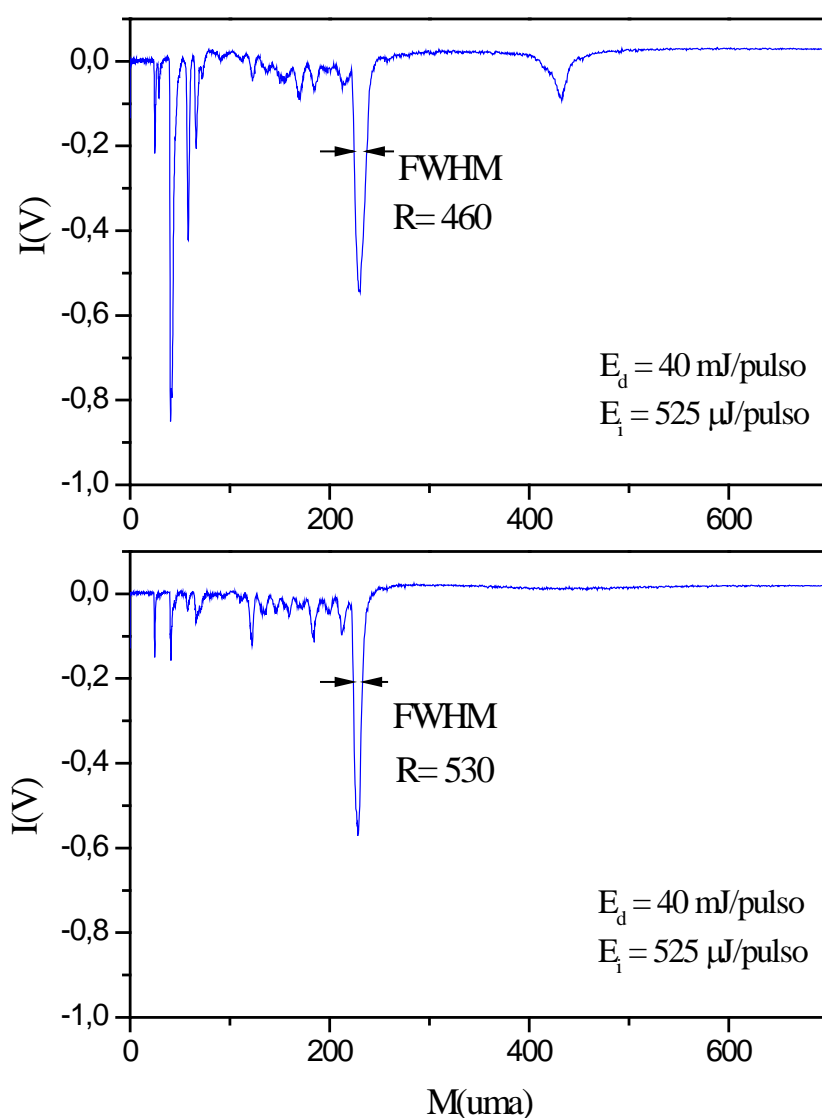


Figura 5.14. Superior: Espectro para la piel de uva obtenido por la técnica LD- REMPI-TOFMS. Inferior: Espectro para la bistorta obtenido por la técnica LD- REMPI- TOFMS.

### **5.3.2. COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS DE *trans*-RESVERATROL POR LAS TÉCNICAS LD + REMPI-TOFMS Y RP-HPLC.**

La comparación entre ambas técnicas en la determinación del contenido de *trans*-resveratrol en las hojas de vid, se realiza muy bien con ayuda de la tabla 3.3 del apartado 3.3.2 de la parte de resultados en la que se incluyen los principales parámetros analíticos: rango de linealidad, reproducibilidad, límites de detección y de cuantificación, tiempo necesario para un análisis, intervalos de confianza así como precisión de medida.

El distinto intervalo de linealidad en ambas técnicas no es muy significativo en cuanto refleja únicamente los límites empleados en el estudio de comparación. Aunque el intervalo empleado en el análisis por RP-HPLC fue de 0-15 mgL<sup>-1</sup> es muy probable que con esta técnica se pueda obtener un intervalo de 0-40 mgL<sup>-1</sup> e incluso superior. Por otra parte, la reproducibilidad de ambos métodos es del mismo orden de magnitud.

Las diferencias más notables se han encontrado en los límites de detección y cuantificación obtenidos para cada técnica de 20 y 67 µg/L, respectivamente para el análisis cromatográfico y 2,1 y 6,3 µg/L para la técnica LD-REMPI-TOFMS. Esto puede ser debido al hecho de que el análisis llevado a cabo por la técnica RP-HPLC se realizó sin preparación previa de la muestra, esto es, se inyectó directamente el extracto de hoja de vid en el cromatógrafo, de modo que la sensibilidad obtenida es menor que la que se hubiera esperado obtener haciendo uso de técnicas de preparación. La limpieza de la muestra previa a la inyección en el cromatógrafo, podría mejorar los límites de detección y de cuantificación. La combinación de la desorción láser de la muestra con la ionización láser resonante junto con la detección espectrométrica de masas permite eliminar el paso de preparación de la muestra en la determinación del *trans*-resveratrol dando como resultado la obtención de una mejor sensibilidad con respecto a la técnica RP-HPLC.

Igualmente debido a la inyección directa en el cromatógrafo, el tiempo necesario en análisis individuales es de sólo 30 minutos. Para la técnica LD-REMPI-TOFMS, es necesario disponer de un buen vacío ( $3 \times 10^{-6}$  mbar como mínimo) en la cámara de detección lo que lleva un tiempo aproximado de 30 minutos en alcanzar dicha presión, este tiempo se puede ver disminuido por la incorporación de bombas adicionales. De este modo, la técnica RP-HPLC

permite un análisis más rápido en el análisis del contenido de trans-resveratrol en los extractos naturales.

Una de las principales ventajas que presentan ambas técnicas es su capacidad de analizar de forma cuantitativa el contenido de trans-resveratrol en muestras naturales dada la inestabilidad térmica y la rapidez de isomerización fotoinducida que presenta dicha molécula. Para ello, la única precaución que se ha tenido que hacer es la de preparar tanto las disoluciones patrones como las muestras en ausencia de luz manteniéndolas para su conservación a la temperatura de -4°C.

Las principales conclusiones que se pueden obtener del estudio comparativo realizado se pueden resumir en las siguientes:

- 1.- El rango de linealidad y reproducibilidad para ambos métodos es del mismo orden de magnitud.
- 2.-La técnica LD-REMPI-TOFMS ha demostrado ser más sensible que la cromatografía líquida, probablemente debido a que la cromatografía líquida ha sido realizada por inyección directa sin pretratamiento de la muestra.
- 3.- La inyección directa por RP-HPLC permite una determinación más rápida para el análisis del trans-resveratrol en extractos de plantas, mientras que la técnica REMPI es menor debido a los requisitos de vacío que necesita.
- 4.- El análisis por HPLC requiere preparaciones previas de muestra lo que implica mayor tiempo y mayor consumo de disolventes y volumen de muestra, además se pueden producir pérdidas de analito durante el análisis. En contra, estas desventajas no están presentes en la técnica LD-REMPI-TOFMS.



### **5.3.3. MÉTODOS DE AUMENTO DEL CONTENIDO ENDÓGENO DE *trans*-RESVERATROL EN UVAS.**

#### **5.3.3.1. EXPERIMENTOS DE ANOXIA.**

##### **5.3.3.1.1. UVA.**

Los experimentos realizados con vistas a aumentar el contenido endógeno de *trans*-resveratrol en uvas han demostrado ser eficaces, como se puede observar en la figura 3.16 del capítulo de resultados en la que se muestra la evolución en el contenido de *trans*-resveratrol en la piel de la uva (variedad Aledo) una vez realizado el tratamiento. Cada punto experimental corresponde a la media de tres medidas con sus correspondientes desviaciones estándar; siendo cada medida la correspondiente al área del pico de tiempo de vuelo para la molécula de *trans*-resveratrol como resultado de 400 espectros tomados durante 40 segundos a una frecuencia de disparo de láser de 10 Hz.

Como se puede ver en dicha figura, el estrés anóxico produce un importante aumento en el contenido endógeno de *trans*-resveratrol en las uvas y esta mejora aumenta con la duración del tratamiento hasta alcanzar su máximo al cabo de las 24 horas con un aumento de casi el triple con respecto al contenido inicial. Para tratamientos más largos (48 horas de anoxia) solamente se observa un ligero aumento con respecto al valor inicial. Estos resultados muestran la inducción de la fitoalexina *trans*-resveratrol en uvas como consecuencia del estrés anóxico y como tal pueden suponer una mejora en las condiciones de calidad y salubridad en las uvas después de la cosecha.

Con respecto al daño producido por el tratamiento, es importante señalar que para tratamientos de hasta 15 horas no se observó daño anóxico, conservando las uvas su característica calidad organoléptica. Sin embargo, para tiempos mayores, la fruta presentaba cierto daño, tanto mayor cuanto mayor fuera el tiempo de exposición a las condiciones anóxicas: 3 y 10% de uvas dañadas para los tratamientos de 24 y 48 horas, respectivamente.

Para determinar la evolución del contenido de *trans*-resveratrol en las mismas uvas durante los tres días siguientes al tratamiento, se realizaron los análisis correspondientes con

los mismos parámetros estadísticos que los indicados anteriormente como se puede observar en la figura 3.17 del capítulo de resultados. Posteriormente al tratamiento anóxico se produce una disminución en el contenido de trans-resveratrol que es mucho más rápido en las uvas que han sido sometidas a los tratamientos más largos: dos días después del tratamiento el contenido en trans-resveratrol no es detectable en las uvas sometidas a tratamientos de 24 o de 48 horas. Por el contrario, el nivel obtenido mediante los tratamientos anóxicos cortos se mantiene durante más tiempo debido a que durante el primer día después del tratamiento el contenido de trans-resveratrol aumenta y en los días posteriores la disminución es mucho más suave. Durante este tiempo se midió igualmente el contenido de trans-resveratrol en las uvas sin tratar que permaneció prácticamente constante, como se muestra por la línea de puntos en la figura. Estos resultados abren una nueva vía para aumentar el contenido endógeno de trans-resveratrol en la piel de la uva por tratamientos anóxicos cortos. Como se puede observar en la citada figura, después de 15 horas de anoxia la mejora obtenida es similar (90% aproximadamente) al aumento obtenido con un tratamiento de 24 horas; sin embargo, después de este tratamiento más corto el contenido de trans-resveratrol permanece durante un tiempo mayor y las uvas no presentan deterioro de sus propiedades organolépticas debido al tratamiento.

Un inconveniente de los tratamientos anóxicos radica en la disminución del contenido de trans-resveratrol observada durante los días posteriores al tratamiento. Esta disminución se atribuye al daño anóxico observado en las uvas después de los tratamientos, especialmente los de mayor duración. Según se pone de manifiesto en la figura 3.16, existe una clara correlación entre la duración del tratamiento (y, por lo tanto, el daño causado por la anoxia) y el mantenimiento del contenido de trans-resveratrol en las uvas. Con el fin de mantener el aumento inducido en el contenido en trans-resveratrol un factor importante que se debe considerar es la velocidad de restauración de las condiciones aeróbicas ya que se ha observado que, después de un periodo de privación de oxígeno la reexposición al aire puede causar daños importantes en los tejidos vegetales, siendo en algunos casos dicho daño más perjudicial que la ausencia misma de oxígeno<sup>233</sup>.

La reexposición al oxígeno produce una serie de reacciones de oxidación durante las cuales el etanol producido por fermentación alcohólica y acumulado en los tejidos durante periodos de anoxia se transforma en acetaldehído, que es considerado el principal responsable del daño postanóxico. Por otra parte, diversos estudios muestran que la oxidación

es uno de los principales procesos de biotransformación en los cuales se ve involucrado el trans-resveratrol, produciendo la degradación del mismo por su transformación en varios productos de oxidación<sup>234</sup>.

El rápido descenso del contenido de trans-resveratrol en las uvas y la correlación observada entre el tiempo de tratamiento anóxico y la velocidad de esta disminución permite atribuir estos resultados a las reacciones de oxidación producidas durante la restauración de las condiciones normales. Estas reacciones de oxidación podrían explicar el pequeño aumento de trans-resveratrol observado después de 48 horas de anoxia, mientras que para los tratamientos de hasta 24 horas el aumento en el contenido de trans-resveratrol crece de forma lineal con el tiempo de anoxia. Por lo tanto, sería de gran interés el estudio de la influencia que pueden tener las condiciones de restauración de las condiciones aeróbicas sobre el daño producido por la anoxia en las uvas después de estos tratamientos.

Desde un punto de vista nutricional, el método puede ser utilizado para obtener uvas y vinos con elevado contenido de trans-resveratrol, cuyas propiedades como nutriente, por sus propiedades beneficiosas para la salud, han sido ampliamente demostradas, como ya se ha señalado anteriormente. Por otra parte, esta inducción de trans-resveratrol en uvas mediante el estrés anóxico permite mejorar la durabilidad de las mismas después de la cosecha, aumentando su resistencia a la infección y a la maduración. Es necesario señalar que esta mejora de la resistencia natural producida por el propio aumento de su contenido endógeno de trans-resveratrol es adicional a la que se produzca por el propio tratamiento anóxico que, como se señaló anteriormente, es un método ampliamente utilizado para mantener la calidad de frutas y verduras y retrasar su senescencia<sup>195, 235</sup>.

#### 5.3.3.1.2. VINO.

Una vez demostrada la eficacia de los tratamientos anóxicos para aumentar el contenido endógeno de trans-resveratrol en la piel de uva, se ha elaborado un protocolo para el tratamiento anóxico de uvas para vinificación como paso previo a la elaboración del vino con el fin de obtener vinos más ricos en trans-resveratrol. El tratamiento consistió en un tratamiento anóxico de 24 horas con el fin de obtener el mayor aumento en el contenido de trans-resveratrol. Con el fin de evitar la rápida disminución en el contenido de trans-

resveratrol observada en los dos días siguientes al tratamiento, las uvas se prensaron inmediatamente después del tratamiento: las uvas se sacaron del tanque de tratamiento anóxico, se transfirieron a la despalladora-estrujadora a través de una tolva y la pasta procesada se transfirió al tanque de fermentación mediante una manguera totalmente limpia para evitar interferencias. Todo este proceso se realizó en sólo 35 minutos.

Como se vió previamente para el caso de las uvas con los tratamientos de 15 y 24 horas son bastante similares, por lo que se podría haber elegido también el primer tratamiento para la obtención del vino enriquecido en trans-resveratrol. La razón para elegir el tratamiento de 24 horas fue la de maximizar la inducción de trans-resveratrol, ya que el deterioro subsiguiente observado se puede evitar elaborando el vino inmediatamente después del tratamiento. Por otra parte el 3% de daño anóxico observado en las uvas después del tratamiento de 24 horas no es importante ya que en cualquier caso las uvas deben ser prensadas para elaborar el vino.

Como se pone de manifiesto en la figura 3.18, el análisis comparativo del contenido de trans-resveratrol en el vino obtenido a partir de las uvas tratadas previamente y en el vino de control, obtenido a partir de uvas sin tratar, permite demostrar que el aumento inducido en las uvas por el tratamiento anóxico ha sido extraído durante el proceso de vinificación, permitiendo la elaboración de un vino enriquecido en trans-resveratrol. En concreto, el contenido en trans-resveratrol del vino enriquecido es tres veces superior al del control.

Por otra parte, el análisis de los parámetros enológicos habituales realizado a ambos vinos permite concluir que no existen diferencias significativas en cuanto a sus principales propiedades físico-químicas y organolépticas, principalmente: densidad, pH, acidez, graduación alcohólica, color, SO<sub>2</sub>, antocianos, etc., como se pone de manifiesto en la tabla 3.4 en la que se muestran los parámetros comparativos de análisis para los dos vinos.

#### **5.3.3.2. TRATAMIENTOS A BAJA TEMPERATURA EN ATMÓSFERA CONTROLADA.**

La combinación de factores tales como el frío y una elevada concentración de CO<sub>2</sub>, ha puesto de manifiesto que el tratamiento con CO<sub>2</sub> retrasa los cambios metabólicos asociados a

la maduración, pero este resultado fue menos pronunciado en las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> que en las no tratadas. Estos resultados son consistentes con los de otros trabajos en los que se sugiere que elevados niveles en concentración de CO<sub>2</sub> pueden actuar, vía respuesta fisiológica en el tejido de la fruta, en el retraso en el deterioro y senescencia de tejidos verdes<sup>236</sup>.

El hecho de presentar un nivel en la concentración de antocianos al final del periodo de almacenamiento en el tejido de la piel, muestra que el efecto del pretratamiento con elevados niveles de CO<sub>2</sub> en compuestos polifenólicos resulta beneficioso.

Las diferencias observadas entre las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y las no tratadas en cuanto a los niveles del gen de la estilbeno-sintasa se refiere, han demostrado que la acumulación del estilbeno inducido en la piel de la uva está altamente regulada en el nivel de la expresión del gen de la estilbeno-sintasa.

El pretratamiento con elevados niveles de CO<sub>2</sub> parece mostrar un claro efecto en la eliminación de la inducción del gen de la estilbeno-sintasa en las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> durante el almacenamiento a baja temperatura. Los resultados obtenidos durante el almacenamiento a baja temperatura nos conducen a que la expresión del gen de la estilbeno-sintasa y la acumulación de trans-resveratrol pueden estar asociadas con la infección fungica.

Los resultados muestran que la eficacia de un aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> disminuye el deterioro total durante el almacenamiento a baja temperatura que no está mediada mediante la inducción de la expresión del gen de la estilbeno-sintasa. Estos resultados, muestran nuevos aspectos de la investigación dirigida a la identificación y mecanismo de respuestas en uva de mesa asociadas con el almacenamiento a baja temperatura.

Por consiguiente, otra alternativa para aumentar el contenido endógeno de trans-resveratrol es haciendo uso de tratamientos en una atmósfera controlada de CO<sub>2</sub><sup>174</sup>. Si bien este último gas da un aumento en el contenido de trans-resveratrol hay que esperar mayor tiempo para que dicho aumento tenga efecto y por consiguiente en este sentido es más inmediato un tratamiento con nitrógeno como el presentado anteriormente.

Con todo, se puede decir que los procesos hipóxicos y anóxicos han mostrado ser de enorme utilidad dado que son procesos no intrusivos y por consiguiente no perjudiciales para

el ser humano en la posterior etapa de posible comercialización de uva con dichas características.

Como se vio en el apartado de Resultados, los experimentos realizados de almacenamiento de uvas a baja temperatura en atmósfera con un alto contenido en CO<sub>2</sub> han demostrado que el pre-tratamiento con CO<sub>2</sub> permite reducir de manera importante los efectos negativos que se observan en las uvas no tratadas almacenadas a 0°C. Los efectos más importantes observados en las uvas tratadas son la disminución de los índices de marchitamiento y oscurecimiento y de la pérdida de humedad, como se puede observar en los resultados en la tabla 3.4, mejorando de esta forma la apariencia visual de la fruta. El tratamiento fue igualmente beneficioso en lo que respecta a la calidad de las uvas, manteniendo mejor el brillo y el color.

Como ya se ha indicado, estos efectos beneficiosos del tratamiento con CO<sub>2</sub> en la apariencia visual de la fruta se pueden explicar porque en los racimos tratados se produce una deshidratación menor que en los tratados, puesta de manifiesto igualmente por una menor pérdida de peso.

Con respecto a los parámetros de calidad de las uvas: color e índice de madurez dado por la relación SSC/TA, los valores de dicho índice son menores en las uvas tratadas, lo que indica que el tratamiento retrasa los cambios metabólicos asociados con la maduración. Estos resultados son consistentes con los de otros trabajos en los que se sugiere que elevados niveles en concentración de CO<sub>2</sub> pueden inducir una respuesta fisiológica en el tejido de la fruta produciendo un retraso en el deterioro y senescencia de tejidos verdes.

Con respecto al contenido en trans-resveratrol después de los 33 días de almacenamiento a 0°C (datos mostrados en la figura 3.19), se puede observar que mientras que las uvas no tratadas presentan un aumento importante en los niveles de trans-resveratrol, este aumento no se manifiesta en las uvas tratadas. Al final de dicho periodo, el contenido de trans-resveratrol en las uvas tratadas fue de 69,89 µg/g, mientras que en las uvas tratadas era de sólo 42,11 µg/g, siendo incluso algo inferior al de las uvas de control al inicio del tratamiento.

La misma diferencia se observó en lo que respecta a los niveles de la estilbeno sintasa (STS), como se observa en la figura 3.20: los niveles del ARN-m de la STS en las uvas no tratadas alcanzan un máximo en el día 28 del tratamiento pero, en cualquier caso, son significativamente mayores que los de las uvas tratadas durante todo el tratamiento. El pretratamiento con elevados niveles de CO<sub>2</sub> tiene un claro efecto negativo sobre la inducción del gen de la STS en las uvas tratadas durante el almacenamiento a baja temperatura.

En cualquier caso, se ha demostrado que existe una correlación entre los niveles de trans-resveratrol acumulados en la piel de la uva y la inducción de los niveles de transcripción de la STS en las uvas tratadas con CO<sub>2</sub> y almacenadas en frío posteriormente: los niveles de ARN-m de la STS permanecieron en valores bajos en comparación con las uvas no tratadas hasta el final del almacenamiento; de forma similar, el contenido en trans-resveratrol en las uvas tratadas permaneció prácticamente constante y a niveles inferiores de los de las uvas no tratadas. Estos resultados se correlacionan bien con los bajos niveles de deterioro debido a las infecciones fúngicas observados en las uvas tratadas, que fue de solo el 5% al final del almacenamiento, mientras que en las no tratadas fue del 25% (tabla 3.4).

Por último en la figura 3.21 se muestran los resultados obtenidos tanto en la expresión del gen de la STS como en el contenido de trans-resveratrol en las uvas después de mantenerlas dos días a 20°C posteriormente al periodo de conservación a 0°C.

Después de los dos días de almacenamiento a temperatura ambiente, el contenido de trans-resveratrol encontrado en ambas uvas es comparable: 76,5 µg/g en las uvas no tratadas frente a 66,6 µg/g en las tratadas. Sin embargo, es importante señalar que, como se ha visto anteriormente, durante el periodo previo de conservación durante 33 días a 0°C, el contenido de trans-resveratrol en las uvas tratadas apenas aumentó con respecto al contenido inicial de control (43 µg/g) siendo de solo el 55% del observado en las uvas no tratadas. Por lo tanto, el aumento observado durante los dos días a temperatura ambiente, es mucho mayor en las uvas tratadas: 72% frente al 10% en las no tratadas.

Por otra parte, el deterioro total de las uvas también sigue una evolución similar cuando las uvas se transfieren durante dos días a temperatura ambiente. Aunque durante este tiempo el deterioro aumenta de forma importante en ambos grupos, dicho aumento es mayor en las uvas tratadas que pasa del 5% al 20%. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, como

durante los 33 días de conservación a 0°C las uvas tratadas han sufrido un menor deterioro, en conjunto durante la duración total del experimento, es decir 33 días a 0°C más dos días a temperatura ambiente, el tratamiento permite una mejor conservación, ya que el deterioro final de las uvas no tratadas supera el 43%.

A modo de resumen, se puede concluir en primer lugar que los resultados obtenidos muestran que el pretratamiento con CO<sub>2</sub> permite mejorar la apariencia y los índices de calidad de las uvas de mesa durante el almacenamiento en frío. Además, el tratamiento disminuyó el deterioro total de las uvas, así como la acumulación de trans-resveratrol en la piel de la uva y los niveles de estilbeno-sintasa. Los resultados muestran que la eficacia del pretratamiento con CO<sub>2</sub> en cuanto a la disminución del deterioro fúngico de las uvas no está mediada por la inducción de la expresión del gen estilbeno-sintasa.

#### 5.3.3.3. ELICITACIÓN SELECTIVA DE trans-RESVERATROL EN PIEL DE UVA MEDIANTE IRRADIACIÓN UV.

En lo referente al sistema experimental, la ventaja de emplear un carrusel de velocidad angular modulable ha permitido controlar el proceso de irradiación de una manera más precisa y con ello poder asignar unas condiciones óptimas de una forma más exacta. A partir de la geometría de dicho sistema se ha logrado establecer un tiempo real de irradiación que, junto con las características del láser, pulsos de 5 ns a una frecuencia de 10 Hz, permiten establecer los valores de exposición directa de las uvas a la radiación láser tal y como se indica en la tabla 5.10.

<b>t<sub>experimental</sub> (min)</b>	<b>t<sub>incidencia</sub> (s)</b>	<b>t<sub>Corregido por frecuencia</sub> (s)</b>
15	72	7,2
30	108	10,8
45	150	15
60	180	18

Tabla 5.10. *Tiempos teóricos y calculados de la incidencia láser.*



El tiempo de incidencia real puede parecer en un principio un tiempo muy corto, pero si se tienen en cuenta las características del láser con el que se está irradiando las uvas, se obtiene que durante el tiempo de incidencia real las uvas están sometidas a la potencia que se indica en la tabla 5.11.

<b>tCorregido por frecuencia (s)</b>	<b>P<sub>Incidentente</sub> (TW/m<sup>2</sup>)</b>
7,2	2,03
10,8	3,04
15	4,23
18	5,07

Tabla 5.11. *Valores de potencias incidentes para cada tiempo de exposición real.*

La mejor forma de lograr semejantes energías es con el empleo de láseres pulsados y de pulsos pequeños; es por ello por lo que la manifestación del efecto de elicitación láser resonante pudiera tener lugar de una manera más rápida con el empleo de láseres pulsados de las características citadas en vez de láseres continuos.

A diferencia de trabajos previos en los que fue necesario un margen de inducción de entre 18<sup>161</sup> a 72<sup>159</sup> horas con el fin de alcanzar el máximo de contenido en trans-resveratrol y cuyo efecto resultó insignificante durante las primeras horas después de la irradiación, en el caso de la irradiación resonante a 302,1 nm el efecto resultó ser inmediato. Como se pone de manifiesto en la figura 3.25. Este hecho se justifica en base al espectro REMPI de la molécula mostrado en la figura 3.23, en donde la irradiación resonante a 302,1 nm proporciona un máximo de señal para la molécula de trans-resveratrol. En este sentido la absorción eficaz de radiación resulta mayor que para otras longitudes de onda con lo que resulta una mayor elicitación en el contenido de trans-resveratrol en la piel de la uva como consecuencia de estar sometida a un proceso más eficaz de absorción de fotones que el correspondiente a otras longitudes de onda para una misma fluencia del láser.

En los resultados obtenidos para las uvas irradiadas a 302,1 nm durante 60 minutos mostrados en la figura 3.25 se observa que el contenido en trans-resveratrol resultó ser del mismo orden que el inicial. Esta conducta, es similar a la obtenida en otros experimentos que apuntan al aumento y mejora del contenido de trans-resveratrol en uvas por medio de otros

estreses externos como los tratamientos anóxicos de las uvas<sup>157</sup> o la infección con *Botrytis Cinerea* de la uva<sup>175</sup> así como en hojas<sup>237</sup>. En todos los casos señalados, se encontró un periodo de tiempo en donde el contenido en trans-resveratrol aumenta, seguido de una disminución súbita en su concentración.

Atendiendo a la figura 3.25 en donde se muestra la evolución en el contenido de trans-resveratrol para la uva sometida a radiación resonante. Parece viable la obtención de uvas con un mayor contenido de trans-resveratrol y por consiguiente más saludables sin más que irradiarlas en un tiempo comprendido entre los 30 y los 45 minutos para las condiciones experimentales expuestas en el apartado 3.3.3.3. La primera impresión visual que resultó inmediatamente después del tratamiento láser fue que no se observaron diferencias de deterioro físico, sumado al hecho de que no se apreciaron variaciones en cuanto a sus propiedades organolépticas resulta que la elicitación de trans-resveratrol en la piel de la uva de esta manera efectuada no le reporta un daño a la misma.

El hecho de haberse observado el fenómeno de la elicitación láser resonante en un compuesto específico de la uva abre la puerta a futuros experimentos cuyos actores principales sean moléculas específicas que se sinteticen en la fruta como respuesta a un estrés externo.

#### ***5.3.4. AUMENTO DE LA DURABILIDAD DE LAS UVAS MEDIANTE LA APLICACIÓN EXTERNA DE EXTRACTOS NATURALES.***

En la ULHM del IP de la UCM se han venido desarrollando desde hace tiempo experimentos que han permitido desarrollar un conservante natural basado en la aplicación de trans-resveratrol para aumentar la resistencia a la infección y maduración de uvas y otras frutas y hortalizas. Como desarrollo posterior y lógico de dichos experimentos, en el marco de la presente tesis doctoral, se ha desarrollado un procedimiento que no se basa en la aplicación del compuesto sintetizado químicamente, sino de un extracto natural obtenido a partir de hojas de vid en las que se sabe que también existe una elevada cantidad de trans-resveratrol, además de otros muchos antioxidantes.

Como se indicó más detalladamente en la parte experimental se han tratado varios racimos de uva blanca por inmersión durante unos segundos en un extracto etanólico en el que

se ha macerado hoja de vid. Como control se han utilizado dos grupos de racimos: un grupo que se ha sumergido sólo en agua y un segundo grupo sumergido en etanol al 5% en agua (la misma proporción que el baño de ensayo, pero sin el extracto de la hoja de vid).

Después del tratamiento, se mantuvieron las uvas bien a temperatura ambiente en condiciones de luz y temperatura controladas, o bien en el frigorífico a 8°C para estudiar la durabilidad de los distintos grupos de ensayo en ambas condiciones.

Los resultados obtenidos tras un plazo de 10 días de almacenamiento a temperatura ambiente se muestran en las fotografías de la figura 3.22. Los racimos que fueron tratados solo con agua presentaban un estado avanzado de putrefacción con un desarrollo importante de que estaban en un estado avanzado de su ciclo reproductivo. Los racimos que fueron tratados con la disolución al 5% de etanol presentan un estado muy similar al primer grupo (aunque algo menos avanzado). Por último, los racimos tratados con la disolución de extracto natural mostraban un aspecto todavía saludable sin ninguna muestra de infección fúngica ni de putrefacción.

Esto demuestra por lo tanto que el efecto obtenido no se debe al etanol presente en el extracto, sino al alto poder antioxidante y antifúngico del trans-resveratrol y otros compuestos extraídos de las hojas de la vid, que permiten retrasar el proceso degenerativo celular y dificultan la infección y desarrollo de microorganismos patógenos en los racimos.

Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento permite también mejorar el tiempo de durabilidad de las uvas en frigorífico. Las fotografías de la Figura 3.23 muestran los resultados obtenidos para tres muestras tratadas como se ha indicado anteriormente, tras 35 días de almacenamiento en frigorífico a 8°C, que son comparables a los descritos anteriormente.

Este método supone un gran avance con respecto a nuestro método anterior basado en la aplicación del trans-resveratrol sintetizado químicamente. En primer lugar permite un ahorro en la compra del producto químico que, debido a la gran actualidad de su utilización como nutraceutico tiene un precio elevado que encarecería el coste de las frutas en caso de que se aplicara el tratamiento anterior a gran escala comercial.

Por otra parte, permitiría el aprovechamiento de productos de desecho tanto de los productores de uva (sea de mesa o para vinificación) como de los productores de vino. En efecto, el trans-resveratrol no solo se encuentra en la hoja de vid, sino también en la parte leñosa de la planta y en la piel de la uva, por lo que el presente tratamiento podría realizarse no solo con extractos obtenidos a partir de hoja de vid, sino también, por ejemplo, con los obtenidos a partir del orujo desechado en las plantas de vinificación y que en la actualidad se emplea únicamente (y en pequeña proporción) para la fabricación de aguardientes.

## **5.4. RESULTADOS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ACOPLADAS A CROMATOGRAFÍA.**

### ***5.4.1. DETECCIÓN DE COMPUESTOS VIA GC.***

#### **5.4.1.1. ANÁLISIS POR GC DEL trans-ESTILBENO.**

La detección y análisis de la molécula de trans-estilbeno, ya sea como sustancia patrón o como compuesto presente en una matriz compleja, ha podido realizarse sin dificultad. El hecho de haberse realizado la detección con un detector FID, cuya selectividad es máxima para los compuestos constituidos por átomos de carbono e hidrógeno, ha servido para proporcionar una relación S/N excelente en estas condiciones experimentales.

A partir del cromatograma obtenido para el trans-estilbeno correspondiente a la inyección de una disolución etanólica de trans-estilbeno de 50 µg/mL y aplicando el programa de temperaturas que se indicó en el apartado de resultados de esta tesis, se obtiene el siguiente valor para el límite de detección.

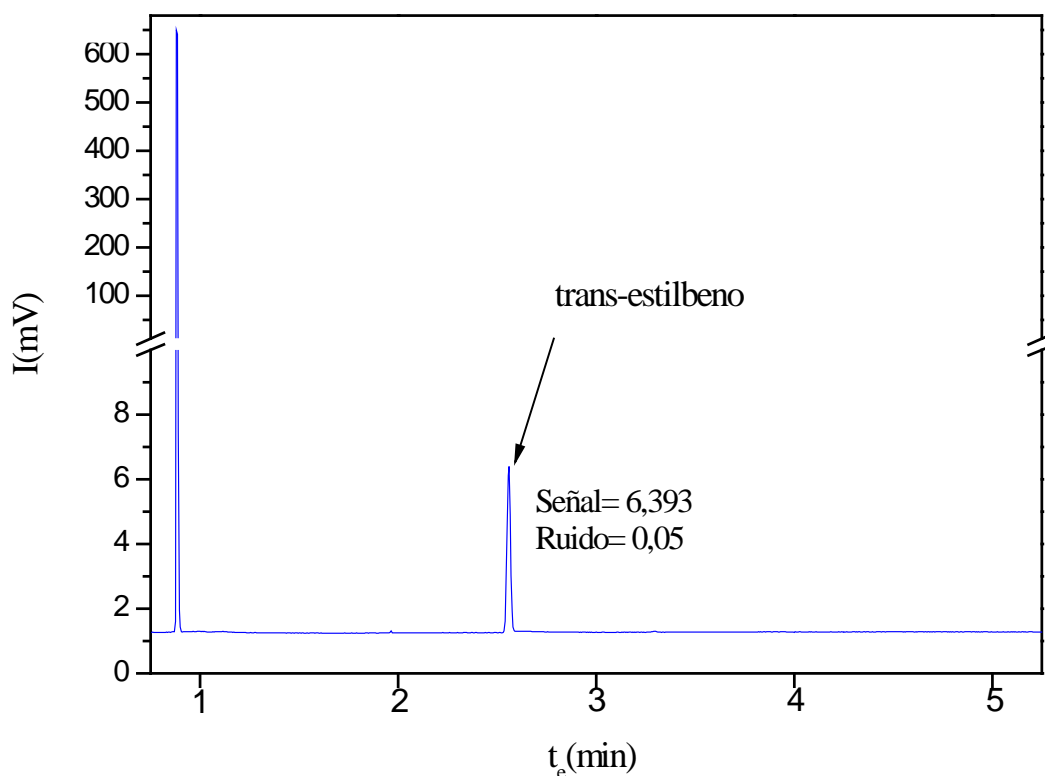


Figura 5.15 .Cálculo del límite de detección por la técnica GC para la inyección de 50  $\mu\text{g/mL}$  de trans-estilbeno.

En el cromatograma de la figura 5.14 la intensidad de señal es de 6,393 mV y el promedio de ruido es de 0,05 mV, por lo que se obtiene una relación señal/ruido de 127,86 para esta muestra de trans-estilbeno. Tomando el límite de detección como tres veces el nivel de ruido se obtiene un valor para dicho límite de detección de 11,7 ng. Este es un límite que está en bastante consonancia con los obtenidos en otros trabajos<sup>238</sup> con empleo de GC con detector FID.

#### 5.4.1.2. DETECCIÓN CROMATOGRÁFICA DE UNA MEZCLA DE MOLÉCULAS CONOCIDAS.

La inyección de una mezcla de compuestos formada esencialmente por compuestos de bajo punto de evaporación y elevada presión de vapor puede provocar la congestión del cromatograma tal y como se vió en la figura 4.3. De las sustancias presentes en la disolución patrón preparada, tres de ellas (benceno, tolueno, fenol) presentan temperaturas de fusión por debajo de los 100°C así como presiones de vapor elevadas a temperatura ambiente. Las

condiciones presentes en la columna van a incrementar los anteriores valores de modo que la elución de los mismos tiene lugar a tiempos muy similares, según se señalo en la tabla 4.4.

El hecho de la congestión en el cromatograma para sustancias de las características anteriormente comentadas, baja temperatura de ebullición y elevada presión de vapor, provoca que su análisis directo por cromatografía de gases en el caso de encontrarse en una disolución con compuestos de mayor temperatura de ebullición y mayor presión de vapor, tenga que realizarse en varias etapas con el fin de ir separando sucesivamente los compuestos de interés por el empleo de diferentes rampas de temperatura. Este hecho, resulta en un exceso de tiempo de análisis en mezclas de sustancias de muy diferentes propiedades físico-químicas lo cual llega a encarecer en gran medida el análisis, así como la obtención de cromatogramas con una falta de buena resolución. Estos problemas se podrán subsanar con el acoplamiento del cromatógrafo de gases con la detección por REMPI-TOFMS como se verá a continuación.

#### **5.4.2. MEDIDA DE PATRONES PUROS POR GC-REMPI-TOFMS.**

##### **5.4.2.1. CALIBRACIÓN EN MASAS PARA LA TÉCNICA GC-REMPI-TOFMS.**

De manera general, para realizar la calibración en masas del espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, hay que asignar al menos uno de los picos que aparece en el espectro a una masa conocida para poder calibrar a partir de este valor toda la escala de tiempos proporcionada por el osciloscopio haciendo uso de la fórmula de tiempo de vuelo que se deduce independientemente del método de ionización. La carga eléctrica  $q$  de un ión de masa  $m_i$  es igual a un número entero de veces  $z$  electrones de carga  $e$ , con lo cual  $q = ez$ . La energía que adquieren,  $E_{el}$ , por moverse a través de un voltaje  $V$  está dada por:

$$E_{el} = qV = ezV \quad [5.13]$$

Esta energía potencial de una partícula cargada en un campo eléctrico se transforma en energía cinética  $E_c$ :

$$E_{el} = ezU = \frac{1}{2} m_i v^2 = E_c \quad [5.14]$$

despreciando la diferente velocidad inicial con lo cual podría considerarse que todos los iones poseen la misma energía cinética al llegar a la zona de vuelo libre después de aplicar el voltaje de aceleración, o lo que es lo mismo, para iones con diferentes masas  $m_1$  y  $m_2$ :

$$E_c(m_1) = E_c(m_2) \quad [5.15]$$

De la relación existente entre el espacio y la velocidad, sustituyendo en la velocidad el valor despejado de 5.14, se llega a la siguiente expresión:

$$t = \frac{s}{\sqrt{\frac{2ezV}{m_i}}} \quad [5.16]$$

La ecuación 5.16 exige que el ión recorra la distancia  $s$  en una zona libre de campo una vez que ha sido completado el proceso de aceleración. Así pues, para dos masas  $m_1$  y  $m_2$  se puede encontrar una relación en función de sus respectivos tiempos de vuelo:

$$\frac{m_2 z_1}{m_1 z_2} = \left( \frac{t_2}{t_1} \right)^2 \quad [5.17]$$

Por consiguiente, *a priori* se conoce el valor del tiempo de vuelo para una masa que alcanza el detector, por lo que a partir de la escala de tiempos que da el osciloscopio podemos determinar el resto de las masas. Se ha comprobado que las moléculas que se han analizado presentan en todos los casos un proceso de ionización con una sola carga. Para ello, se ionizaron de forma individual cada una de las sustancias de interés junto a otra molécula de modo que la disminución de la energía en el proceso de ionización daba lugar siempre al mismo pico. Este hecho, permite simplificar la expresión anterior para nuestro proceso:

$$\frac{m_2}{m_1} = \left( \frac{t_2}{t_1} \right)^2 \quad [5.18]$$

Como la longitud de onda empleada para la ionización ha sido 266 nm el primer pico conocido que se va a asignar será el correspondiente a tolueno debido a su excelente ionización con esta longitud de onda. Como se desprende de las expresiones para el tiempo de vuelo, el parámetro más importante es el punto de ionización el cual debe de estar fijo y por consiguiente con el fin de ajustar temporalmente el osciloscopio se introduce tolueno a través de la válvula de aguja de modo que se caracteriza el pico de tolueno con la consiguiente acotación temporal en el osciloscopio. Una vez realizado el ajuste temporal y aprovechando que el primer pico a detectar ha sido tolueno, la inyección de 1  $\mu\text{L}$  de tolueno a través del puerto de inyección del cromatógrafo proporcionó un pico que coincidió exactamente con el pico de tolueno inicial introducido por la válvula de aguja, con lo cual se descarta cualquier posible fragmentación de dicha molécula en su trayecto hasta el punto de ionización. La inyección de tolueno proporciona un espectro de tiempo de vuelo que se muestra en la figura 5.15.

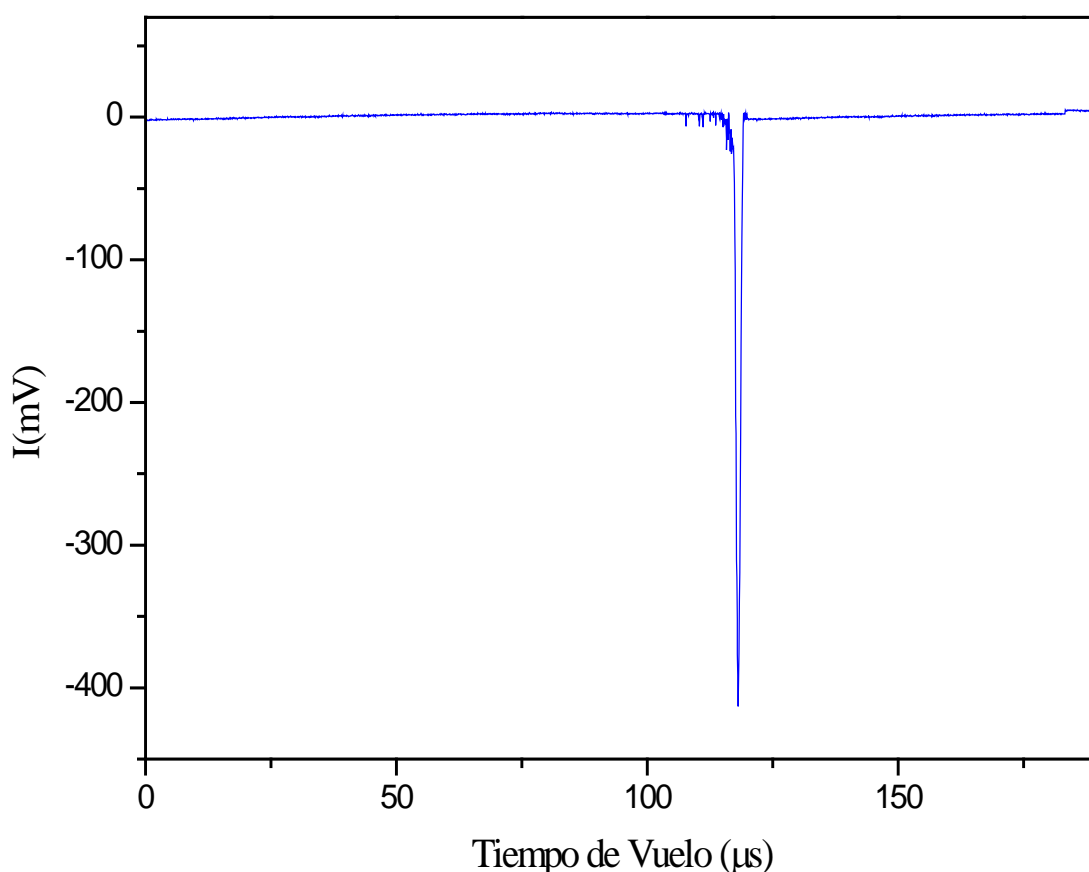


Figura 5.16. Espectro de tiempo de vuelo para el tolueno obtenido por medio de la técnica GC-REMPI-TOFMS.



Una vez caracterizado un pico en masa y tiempo se está en condiciones de caracterizar el resto de picos que aparezcan en un tiempo de vuelo. Conocidas dos masas, se puede calcular la constante característica del tiempo de vuelo y por consiguiente reasignarlas de manera más precisa a partir de la siguiente expresión<sup>239-241</sup>:

$$T - T_C = K\sqrt{M} \quad [5.19]$$

donde  $T_C$  es una corrección desconocida para el tiempo de vuelo real  $T - T_C$  y  $T$  es el tiempo de vuelo medido.  $K$  es una constante de proporcionalidad determinada a través de la medida del tiempo de vuelo de dos masas  $M_1$  y  $M_2$ :

$$K = \frac{T_1 - T_2}{\sqrt{M_1} - \sqrt{M_2}} \quad [5.20]$$

Por consiguiente, la medida de una masa desconocida,  $M_U$ , se determina por comparación con una masa conocida  $M_K$  de acuerdo con la siguiente expresión:

$$M_U = \left[ \sqrt{M_K} + \frac{T_U - T_K}{K} \right]^2 \quad [5.21]$$

En la figura 5.17 se muestra el espectro de masas obtenido por aplicación de las anteriores expresiones a los espectros de tiempo de vuelo.

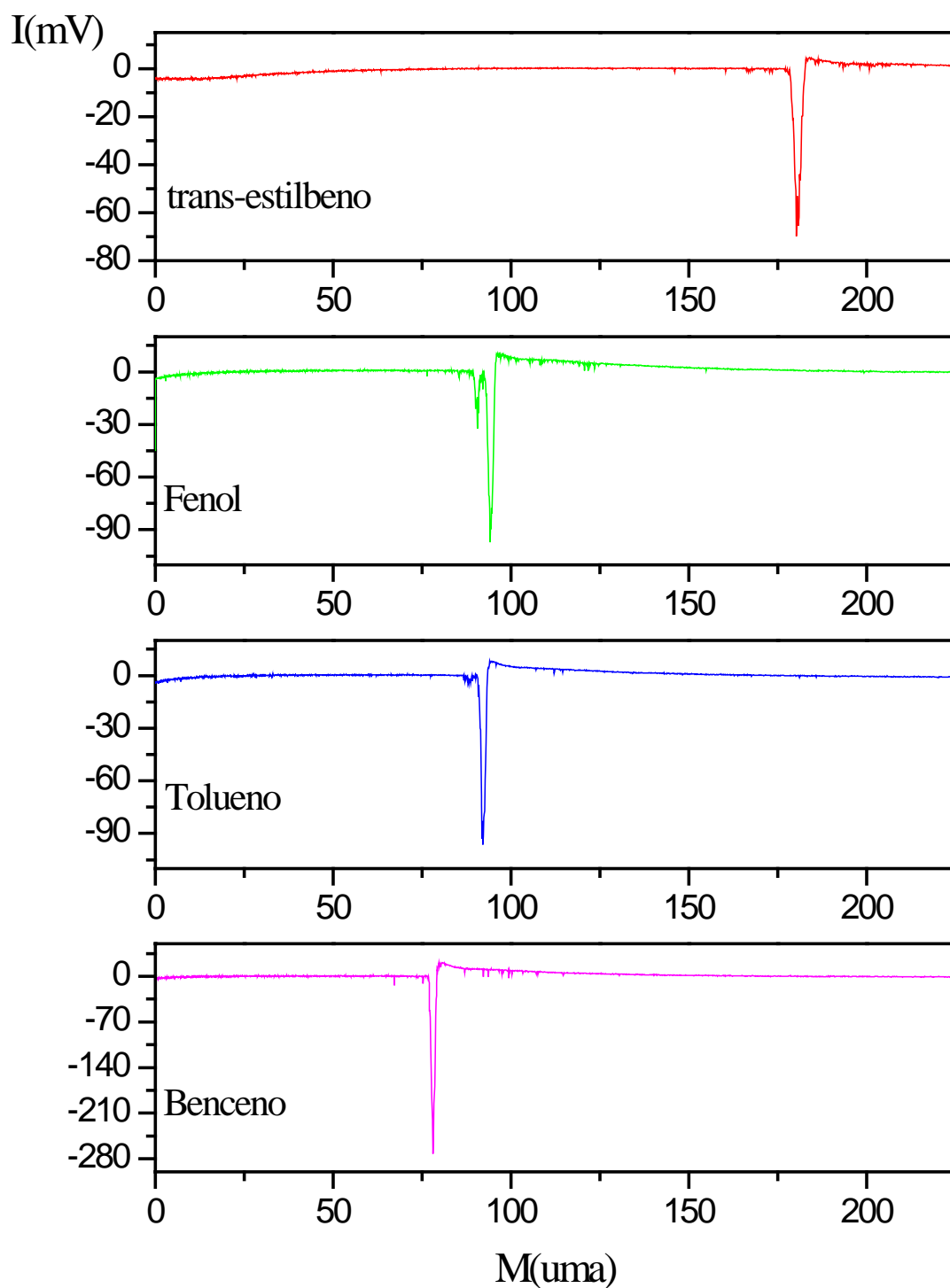


Figura 5.17. Espectros de masas obtenidos por medio de la técnica GC-REMPI-TOFMS, para las diversas sustancias señaladas en cada espectro.

En la tabla 5.12 se puede ver la comparación entre los valores tabulados y los asignados para cada uno de los compuestos anteriores, a partir de los espectros medidos.

Compuesto	$M_{\text{Tabulada}} \text{ (uma)}$	$M_{\text{Asignada}} \text{ (uma)}$
Benceno	78,11	78,12
Tolueno	92,14	92,14
Fenol	94,11	94,12
trans-estilbeno	180,25	180,28

Tabla 5.12. *Comparación de las masas obtenidas en el proceso de calibración con las masas reales tabuladas.*

De la asignación de masas se desprende la excelente concordancia con los valores reales tabulados para las mismas sustancias difiriendo el valor asignado del tabulado únicamente en el segundo decimal para las masas de benceno, fenol y trans-estilbeno.

Con el fin de ver si las masas calculadas están contempladas por el error experimental, en la siguiente tabla se exponen los intervalos en masa obtenidos para la resolución del sistema, para cada una de las masas analizadas.

Compuesto	$M_{\text{Tabulada}} \text{ (uma)}$	$\Delta m$
Benceno	78,11	0,13
Tolueno	92,14	0,16
Fenol	94,11	0,16
trans-estilbeno	180,25	0,32

Tabla 5.13. *Intervalo de masas aceptado a partir de las masas tabuladas para el TOFMS.*

La comparación de los valores experimentales con el error máximo admitido para cada una de las masas indica que la calibración es aceptable dentro del intervalo de masas analizado.

Las buenas señales obtenidas en la ionización a 266 nm para cada uno de los compuestos se ve justificada por la eficaz ionización que presentan los compuestos fenólicos y aromáticos a dicha longitud de onda<sup>242,243</sup>.

El hecho de emplear un programa de temperatura que contempla etapas con temperaturas mayores a 200°C provoca lo que se conoce como *sangrado* de la columna cromatográfica consecuencia del desprendimiento de la fase estacionaria que recubre uniformemente el interior del tubo capilar en su mayoría cadenas de dimetilxiloso,  $\text{SiO}(\text{CH}_3)_2$ . Aunque la columna comercial empleada contiene moléculas estabilizadoras de la fase estacionaria con el fin de disminuir el sangrado, es evidente que este proceso no ha podido ser eliminado completamente. De este modo, la línea base en el caso del trans-estilbeno aumenta ligeramente, pues lo que se obtiene con el aumento de la temperatura es un aumento en el nivel de ruido en los espectros de tiempo de vuelo.

En el caso del fenol, se aprecia de forma clara la aparición de un pico en el espectro de tiempo de vuelo que le corresponde una masa de 91 uma. Este hecho es indicativo que la molécula de fenol ha tenido o bien que reaccionar con alguna otra o quizás fragmentarse. Esta última hipótesis queda descartada, pues un patrón de fragmentación para la molécula de fenol<sup>244</sup> obtenido por bombardeo electrónico asigna los valores en porcentaje de 1,7 y 6,5 respectivamente a los fragmentos de masa inferiores en 1 uma por debajo y por encima de la masa del fenol descartando la existencia de un fragmento a la masa de 91 uma.

Los grupos dimetilxiloso son muy sensibles a la humedad del ambiente; es por ello por lo que hay que intercalar un filtro de humedad entre la línea del gas portador y la columna cromatográfica. Aún así, las conexiones no aseguran una estanqueidad perfecta y con el tiempo se puede ir produciendo una paulatina intromisión de humedad del ambiente y por consiguiente originar grupos alcohólicos en el dimetilxiloso. Este hecho pone de relieve que exista una interacción entre dichas moléculas recientemente formadas y el fenol resultando propicia la reacción mostrada en la figura 5.16.

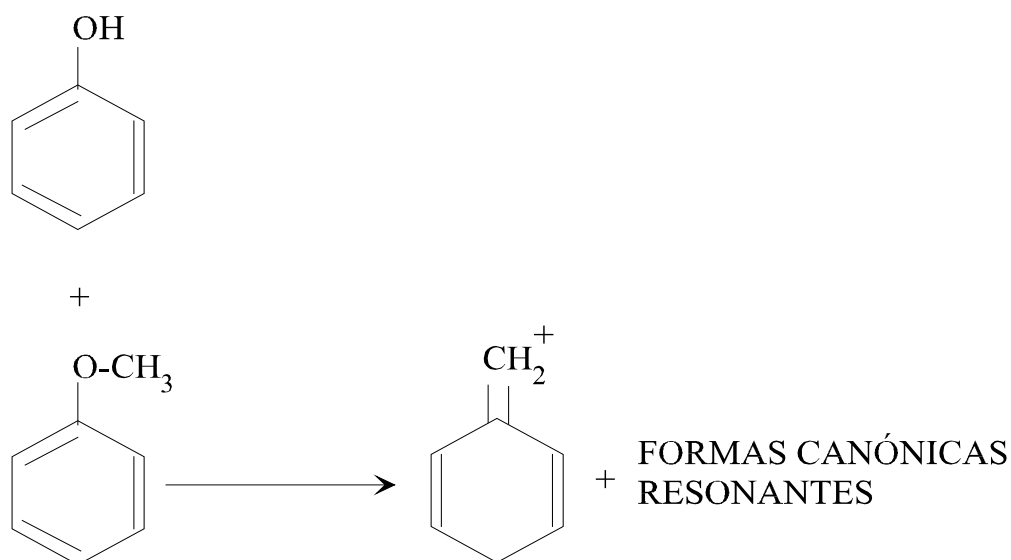


Figura 5.18. *Reacción en la columna entre el fenol y la fase estacionaria.*

El pico que aparece adyacente al fenol y que se ha caracterizado atendiendo a la reacción anterior se puede corresponder con el pico que aparece en el cromatograma de la figura 4.2, pues al tratarse de un compuesto con una menor presión de vapor aparece retenido a mayor tiempo, resultando ser de 0,62 min. Esta reacción ya no tiene lugar en la línea de transferencia, pues como tal se trata de un tubo capilar desactivado.

En el caso del tolueno, se aprecia un pequeño pico que es persistente con la señal del pico padre de tolueno, a una masa de 89 uma. En este caso, el patrón de fragmentación del tolueno sí contempla un pico a esa masa en una proporción del 4%.

La aparición de fragmentos se ve acentuada por el hecho de haber empleado una temperatura en el inyector de 290°C como consecuencia de optimizar la elución del trans-estilbeno. Al ser compuestos muy volátiles, a dicha temperatura han podido sufrir una ligera fragmentación.

## 5.5. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA GC-REMPI-TOFMS.

Como etapa previa a la aplicación analítica del método, se realizó el estudio de validación del método analítico para análisis de trans-estilbeno mediante GC-REMPI-

TOFMS, de esta manera se pueden asegurar los resultados obtenidos dentro de un intervalo de confianza.

En la tabla 5.14 se resumen los parámetros estudiados desde el punto de vista de la validación: repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, selectividad, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación.

Todos los valores obtenidos en los diferentes experimentos de validación cumplen de forma holgada los criterios que deben poseer los sistemas analíticos destinados al análisis de trazas en muestras complejas<sup>245</sup>: repetibilidad < 5%, reproducibilidad < 10%, exactitud > 90%, linealidad con  $r > 0,999$ .

Parámetro	Valor
REPETIBILIDAD	RSD = 2,15 %
REPRODUCIBILIDAD	RSD = 2,7%
LINEALIDAD	$r = 0,998$
SELECTIVIDAD	Ionización REMPI+TOFMS
EXACTITUD	99,77%
LIMITE DE DETECCION	$3,8 \frac{\mu g}{L}$
LIMITE DE CUANTIFICACION	$12,8 \frac{\mu g}{L}$

Tabla 5.14. *Resumen de los valores obtenidos de los experimentos de validación del sistema GC-REMPI-TOFMS para la determinación de trans-estilbeno.*

Atendiendo a los valores obtenidos en esta tesis se puede concluir la excelente fiabilidad que proporciona el sistema experimental GC-REMPI-TOFMS en el análisis y estudio de la molécula de trans-estilbeno. Aunque se han publicado algunos desarrollos que acoplan GC con REMPI<sup>246</sup> usando equipos sofisticados y válvulas de expansión, en esta tesis se ha desarrollado un sistema más directo y sencillo de acoplamiento GC a la MS sin perder la selectividad y resolución del REMPI.

Aunque la linealidad presenta un valor menor en el coeficiente de regresión que con respecto al mínimo exigido, esta pequeña diferencia no es demasiado importante, si se tiene en cuenta que la ordenada en el origen está incluida en el intervalo de confianza con un nivel de probabilidad de un 99%. Si se realiza el análisis estadístico forzando a que la recta de ajuste pase por el origen se obtendría un coeficiente de regresión superior a 0,9999.

## 5.6. ANÁLISIS DE *trans*-ESTILBENO EN PIEL DE UVA.

### 5.6.1. ANÁLISIS DE *trans*-ESTILBENO EN PIEL DE UVA POR GC.

Los valores que se obtienen del análisis de la relación señal-ruido correspondientes al cromatograma de la figura 5.16 proporcionan un límite de detección de 12,8 ng por lo que en la mayoría de los casos se podrá realizar el análisis de la molécula de *trans*-estilbeno en la piel de la uva por simple filtrado de la solución en la que esta presente sin recurrir a operaciones como la separación, preconcentración etc. previamente al análisis.

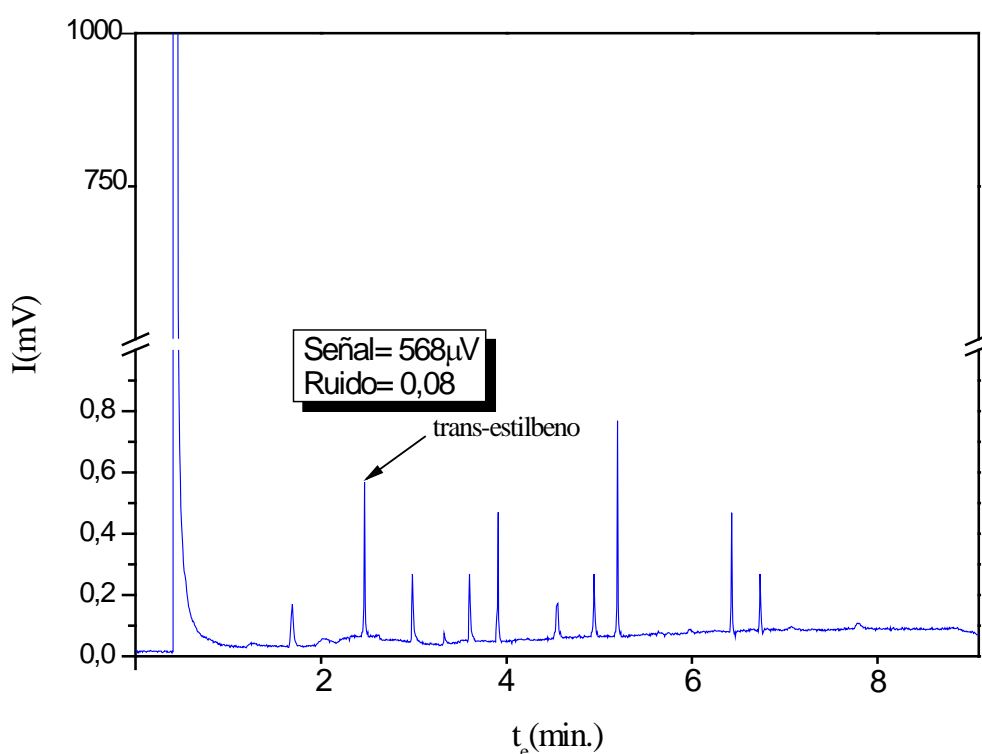


Figura 5.19. Relación señal/ruido para la molécula de *trans*-estilbeno obtenido por cromatografía de gases procedente de una matriz de piel de uva.

El hecho de que el trans-estilbeno sea uno de los primeros compuestos en aparecer lo aleja de la zona de sangrado, que según se puede apreciar, es máxima en las etapas finales en las cuales se alcanza la máxima temperatura. Este hecho provoca que el pico obtenido se vea muy liberado del ruido introducido por el sangrado. La resolución con la que se obtiene el pico correspondiente al trans-estilbeno lo hace óptimo para, según se comentó, proceder a un análisis directo de la piel de la uva.

### **5.6.2. ANÁLISIS DE *trans*-ESTILBENO EN PIEL DE UVA POR GC-REMPI-TOFMS.**

Los cálculos derivados de la figura 4.10 del apartado de resultados muestran un límite de detección de 3,8 pg para la inyección directa de una disolución de 50 µg/mL de trans-estilbeno en etanol. Es necesario señalar que el análisis se ha realizado utilizando una longitud de onda no resonante con el trans-estilbeno. Así pues, dicho límite de detección podría aumentarse por el empleo de una ionización láser resonante con dicha molécula aprovechando de este modo la máxima sensibilidad proporcionada por la técnica REMPI. En cuanto a la relación de *split*, el aumento o disminución de la misma no redundaría en una mejora del límite de detección.

El hecho de producirse un sangrado en la columna cromatográfica con el aumento de la temperatura, como se ha visto anteriormente, provoca una disminución en la relación señal-ruido, resultando tanto mayor cuanto mayor es la temperatura a la que eluye el compuesto.

Si bien, debido a que se produce la elución del pico de trans-estilbeno en las primeras etapas de la rampa de temperatura, se logra su medición alejándola del mayor sangrado por parte de la columna cromatográfica que se produce en las últimas etapas y con ello, se evita la obtención de un espectro con un mayor grado de ruido. Así pues, la situación ideal en el análisis por GC-REMPI-TOFMS es proceder a la optimización de las condiciones de elución en el compuesto de interés para de esa forma poder reducir el nivel de ruido que va a entrar en la cámara de ionización.



En la figura 5.17 se presentan los espectros obtenidos por GC-REMPI-TOFMS para las distintas moléculas con distintos tiempos de elución de modo que se puede apreciar como el tiempo de elución en una rampa programada de temperatura puede afectar al nivel de ruido.

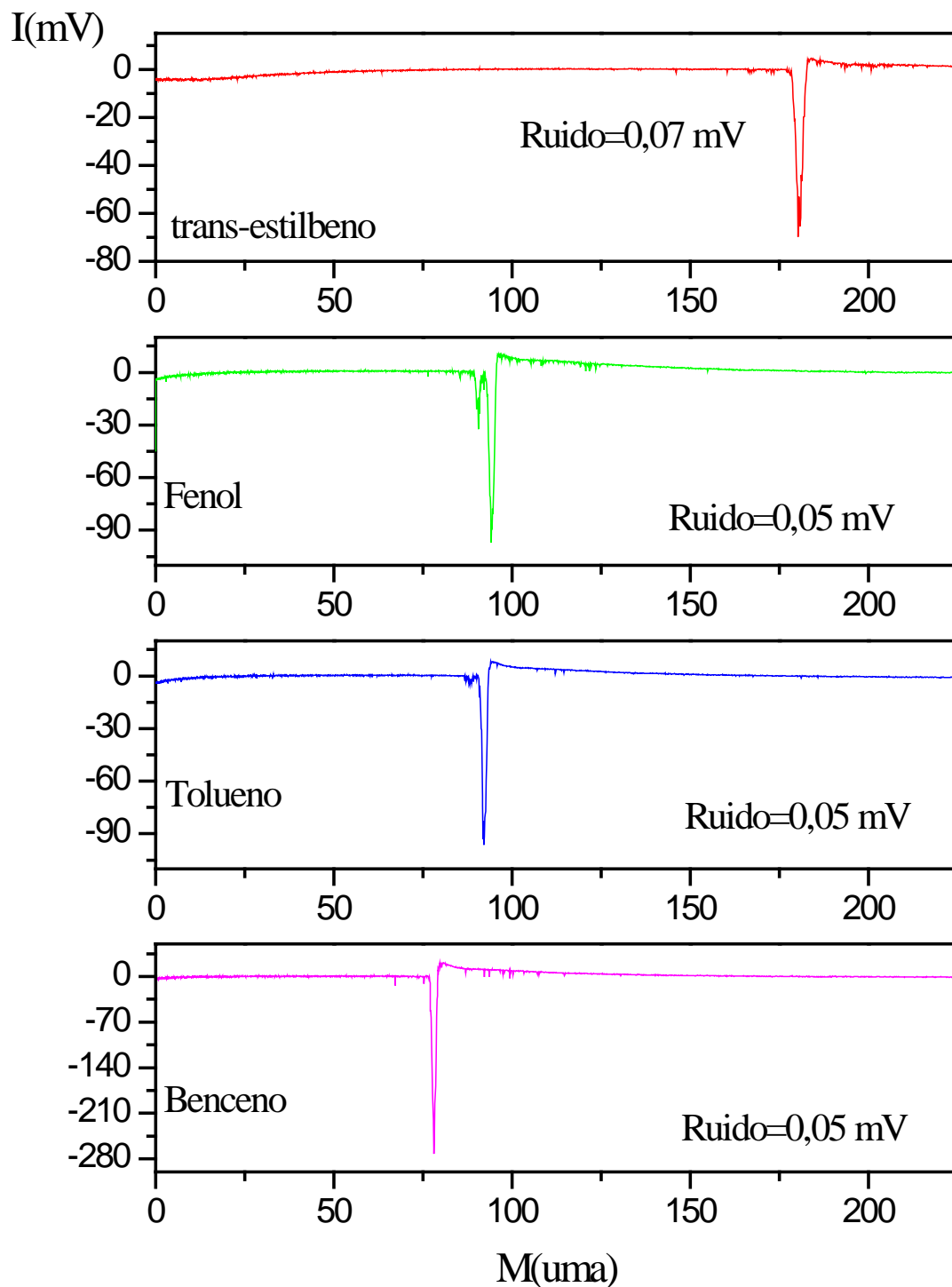


Figura 5.20. Valores del ruido para los espectros de las distintas moléculas obtenidos por las técnica GC-REMPI-TOFMS.

Tal y como se desprende de los valores obtenidos para el ruido a partir de la figura 5.17, el mayor valor de ruido se obtiene para la molécula de trans-estilbeno y para el resto es el mismo. A partir de los datos de la rampa de temperatura de la tabla 4.1 y de los valores de los tiempos de elución puestos en la tabla 4.4, se desprende que la elución del compuesto de trans-estilbeno se realiza a tiempos mayores que la del resto de compuestos resultando en una mayor temperatura en la columna y por consiguiente se produce un ligero aumento en el sangrado que redundo en una señal de ruido ligeramente superior a la del resto de compuestos en cuyo caso al presentar tiempos de elución muy parecidos y casi instantáneos presentan el mismo valor de ruido.

## **5.7. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS GC/GC/REMPI-TOF/GC-REMPI-TOFMS.**

### ***5.7.1. LÍMITE DE DETECCIÓN POR LA TÉCNICA LD-REMPI-TOFMS.***

Con el fin de comparar las técnicas GC, LD-REMPI-TOFMS, GC-REMPI-TOFMS, es menester disponer de resultados para la misma molécula obtenidos en las condiciones óptimas en cada sistema experimental. Por ello, se realizó el experimento de detección de trans-estilbeno por la técnica LD-REMPI-TOFMS en la condición de ionización de 266 nm.

Se depositaron sobre una placa de vidrio pyrex una disolución de 5 µg de trans-estilbeno en etanol junto con 30 mg de cinc. La ionización de la muestra desorbida se realiza con longitud de onda de ionización de 266 nm y la señal se promedia 400 veces. Un espectro obtenido en dichas condiciones experimentales se muestra en la figura 5.18.

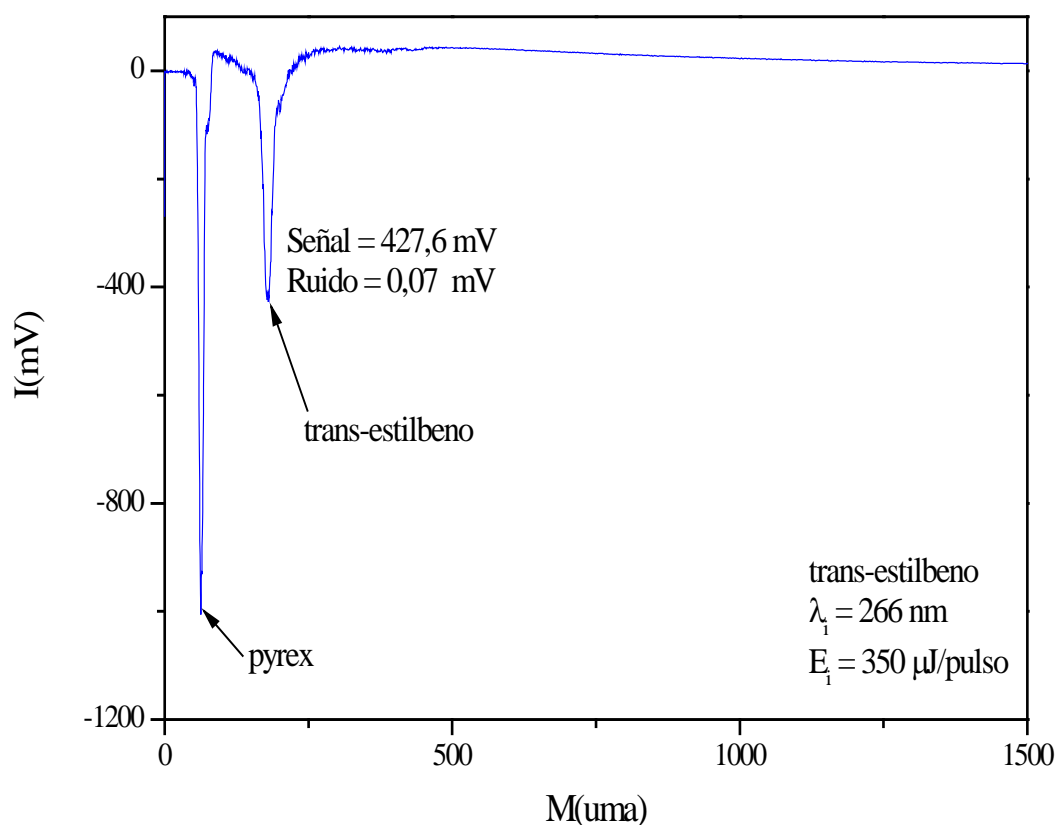


Figura 5.21. Cálculo del límite de detección por la técnica LD-REMPI-TOFMS para la molécula de trans-estilbeno.

En dicho espectro, la intensidad de señal de trans-estilbeno es de 427,6 mV y el promedio de ruido es de 0,07 mV, lo que proporciona una relación  $S/N = 6108,6$ . Para calcular la cantidad desorbida realmente es necesario tener en cuenta la relación entre el área de desorción y el área de disco; la muestra conteniendo 5  $\mu\text{g}$  de trans-estilbeno fue depositada en el disco pyrex de 5 cm de diámetro que proporciona un área de 1963  $\text{mm}^2$  y el área de desorción correspondiente a la superficie del spot láser incidente, con un diámetro del haz de 3 mm, es de 7  $\text{mm}^2$  por lo que la cantidad de sustancia desorbida en cada impacto del láser con la superficie del disco pyrex, en donde esta depositada la muestra, resulta ser de  $[5 \times 10^{-6} \text{ g} \times (7 \text{ mm}^2 / 1963 \text{ mm}^2)] = 1,78 \times 10^{-8} \text{ g}$ . Tomando el límite de detección como tres veces el nivel de ruido, resulta para dicho límite la cantidad de:

$$[1,78 \times 10^{-8} \times (3/6108,6)] = 8,74 \times 10^{-12} = 8,7 \text{ pg.}$$

### 5.7.2. COMPARACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN.

En la tabla 5.15 se presentan los límites de detección obtenidos por cada una de las técnicas empleadas a lo largo de esta tesis.

Técnica	Límite de Detección
GC(trans-estilbeno en uva)	12,8 ng
LD-REMPI-TOFMS	8,7 pg
GC-REMPI-TOFMS	3,8 pg

Tabla 5.15. *Comparación de los límites de detección según la técnica empleada para el trans-estilbeno.*

Los límites obtenidos por las técnicas LD-REMPI-TOFMS y GC-REMPI-TOFMS son tres órdenes de magnitud superior al obtenido por GC. Se observa también que el límite de detección para la muestra de trans-estilbeno analizada por la técnica de GC-REMPI-TOFMS es 2,3 veces superior al obtenido por la técnica LD-REMPI-TOFMS. Si se compara el valor obtenido para el límite de detección para el trans-resveratrol según la técnica LD-REMPI-TOFMS<sup>90</sup> se aprecia un menor límite de detección para la molécula de trans-resveratrol. Esta diferencia con respecto al obtenido para la molécula de trans-estilbeno viene justificada por el hecho de no estar trabajando en el máximo de resonancia de la ionización de la molécula de trans-estilbeno y por consiguiente dicho valor en el límite de detección podría verse mejorado sustancialmente para la molécula de trans-estilbeno.

El valor comparado para el límite de detección entre las técnicas GC, LD-REMPI-TOFMS y GC-REMPI-TOFMS pone de manifiesto la sinergia derivada del hecho de acoplar un cromatógrafo de gases, en cuyo caso nos dará una separación cromatográfica, al REMPI-TOFMS que supone sustituir el detector propio del cromatógrafo por otro de mayor resolución, selectividad y sensibilidad.

Hasta el momento de escribir esta tesis no se han encontrado estudios cuantitativos de la molécula de trans-estilbeno en frutas y por consiguiente no se ha podido realizar la

comparación con otras técnicas. Este hecho viene justificado en que el mayor interés analítico se centra en los derivados polifenólicos del mismo tales como el trans-resveratrol.

En lo referente a las resoluciones espectrales obtenidas en las diferentes técnicas GC-REMPI-TOF y LD-REMPI-TOF, haciendo uso de la expresión 5.4, en la tabla 5.16 se da el valor obtenido por las diferentes técnicas para la molécula de trans-estilbeno.

<b>Técnica</b>	<b>Resolución</b>
GC	450
LD-REMPI-TOFMS	500
GC-REMPI-TOFMS	730

Tabla 5.16. *Comparación de la resolución obtenida por las diferentes técnicas para el compuesto de trans-estilbeno.*

Las diferencias en resolución que se indican en la tabla 5.9 son debidas fundamentalmente:

- 1) En la técnica GC-REMPI-TOFMS la incidencia del haz láser con el haz efusivo se hace perpendicularmente. En el caso de la técnica LD-REMPI-TOFMS, la desorción introduce un componente de absorción térmica en la superficie que esta ausente en el caso de la técnica GC-REMPI-TOFMS. Como consecuencia, el compuesto desorbido puede estar más caliente translacionalmente, no sólo en sus grados internos, y por consiguiente la anchura del pico en el espectro de tiempo de vuelo resulta mayor en el caso LD-REMPI-TOFMS que en el GC-REMPI-TOFMS.
- 2) El hecho de producirse una separación previa en la columna cromatográfica da como resultado que la sucesiva entrada de compuestos en la cámara de ionización de forma individual elimina posibles interacciones con otras moléculas.
- 3) Durante el proceso de desorción en la técnica LD-REMPI-TOFMS, aunque las condiciones de alto vacío permiten minimizar el daño sufrido en la muestra por la

radiación láser, siempre existe la posibilidad de que una ínfima cantidad se rompa, resultando esta la etapa crítica en el sistema LD-REMPI-TOFMS. La etapa más crítica en el proceso GC-REMPI-TOFMS es el paso por la inyección dado que es una etapa en la que un exceso de temperatura puede provocar la ruptura de sustancias o moléculas presentes en la muestra y con ello disminuir la sensibilidad de la técnica. Para el caso concreto de la molécula de trans-estilbeno se ha demostrado que su análisis es más sensible por el empleo de la técnica GC-REMPI-TOFMS que por la técnica LD-REMPI-TOFMS.

A modo de resumen del estudio comparativo realizado entre las técnicas LD-REMPI-TOFMS y GC-REMPI-TOFMS, a continuación se señalan las principales ventajas observadas en ambas técnicas:

➤ LD-REMPI-TOFMS

- ✓ Permite obtener un mayor número de promedios para la sustancia o molécula a analizar, y por tanto un mejor cociente S/N.
- ✓ Variando la posición de la placa se puede obtener una nueva superficie fresca y por consiguiente permite un mayor tiempo para optimizar la señal en tiempo real.

➤ GC-REMPI-TOFMS.

- ✓ No necesita de una etapa de desorción.
- ✓ Se produce un aumento en la resolución.
- ✓ Se produce un aumento en el límite de detección.
- ✓ En el punto de ionización se encuentra sólo la molécula de interés lo que evita posibles interferencias con otras sustancias o compuestos.
- ✓ Se pueden caracterizar compuestos en base a datos cromatográficos.

## **6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.**

Esta tesis está dividida en dos bloques claramente diferenciados siendo el denominador común de ambos el análisis y estudio de moléculas de interés biológico. En la primera parte de la misma, dado los enormes beneficios que para la salud reporta el consumo de la molécula de trans-resveratrol, se han continuado los estudios que se venían desarrollando en la ULHM del IP para dicho compuesto. El empleo de la técnica LD-REMPI-TOFMS ha permitido por un lado, el estudio y análisis del trans-resveratrol dentro de matrices complejas de origen biológico y por otro ha permitido la optimización por separado de los procesos de desorción e ionización. En concreto, se ha llevado a cabo un desarrollo instrumental que incorpora un pasamuros con dos grados de libertad, uno de rotación y otro de translación, del sustrato donde se deposita la muestra. Esto ha mejorado considerablemente la etapa de desorción redundando en una mayor intensidad de señal, para una misma fluencia en los láseres de desorción e ionización, que la ya existente.

Se ha estudiado el espectro REMPI para la molécula de trans-resveratrol por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS, en estas nuevas condiciones mejoradas de desorción. Para ello se ha empleado una mayor resolución en la longitud de onda de ionización, llevándose a cabo la ionización en pasos de 0,05 nm. La obtención de una parte del espectro REMPI para la molécula de trans-resveratrol en estas nuevas condiciones, ha permitido observar unas bandas espaciadas en un valor constante de frecuencia. Con el fin de completar el espectro obtenido en las condiciones citadas, se procedió a realizar un experimento complementario en una máquina de Haces Moleculares para, de esta manera, disponer del mismo espectro REMPI de la molécula de trans-resveratrol en unas condiciones más frías vibro-rotacionalmente. La comparación de los espectros obtenidos por ambas técnicas ha permitido asignar, sin ningún tipo de ambigüedad, un espaciado en frecuencia. La escasa bibliografía existente sobre la espectroscopia de la molécula de trans-resveratrol en el momento de escritura de esta tesis ha motivado la comparación con otra molécula de estructura muy similar al trans-resveratrol pero mucho más documentada: el trans-estilbeno. En este sentido, se han obtenido los espectros de infrarrojo de ambas moléculas y de la asignación de bandas llevada a cabo por el profesor Manuel Gil Criado del Departamento de Química-Física de la Facultad de CC.Químicas de la UCM se ha logrado disponer de la información necesaria para una comparación rigurosa.

Con el fin de disponer de datos de comparación directa entre la técnica LD-REMPI-TOFMS para la detección y análisis de trans-resveratrol y otra técnica analítica de uso común



en su detección y análisis, HPLC, se ha llevado a cabo la comparación entre ambas para lo cual, se ha actuado en colaboración con el equipo de la profesora M<sup>a</sup> Jesús Santos del departamento de Química Analítica de la Facultad de CC. Químicas de la UCM. El resultado de la comparación en el contenido de trans-resveratrol en hoja de vid por dos técnicas completamente diferentes, ha puesto de manifiesto unas claras ventajas y desventajas de ambas técnicas que de otro modo sólo hubieran sido previsibles.

Las formidables características de la molécula de trans-resveratrol en cuanto a sus propiedades beneficiosas para el consumo humano han motivado el estudio de nuevos procesos encaminados a la obtención de una uva de mayor calidad por el aumento en el contenido endógeno en dicha molécula. De este modo, se han desarrollado experimentos conducentes a la elicitación de trans-resveratrol en uva tras ser sometida a diferentes períodos anóxicos. Estos resultados han puesto de manifiesto la existencia de vías de aumento del contenido endógeno de trans-resveratrol en uvas en función del distinto tiempo de exposición en dicha atmósfera anóxica. Se ha observado que el aumento en el contenido de trans-resveratrol, de esta forma obtenido, no ha perjudicado a la uva en cuanto a sus propiedades organolépticas tal y como lo ponen de manifiesto los índices de calidad para las uvas tratadas y no tratadas. La información que se desprende de los experimentos de anoxia ha motivado la elaboración de un protocolo para desarrollar un vino, en colaboración con Bodegas Valsardo, con un mayor contenido de trans-resveratrol con todos los beneficios para la salud que ello supone.

En colaboración con el equipo de investigación de la Dra. Carmen Merodio del Instituto del Frío del CSIC, se han estudiado los efectos de la combinación de baja temperatura junto con unas condiciones en atmósfera controlada con elevada concentración de CO<sub>2</sub>, en la conservación de la uva de mesa. En este sentido, no solamente se ha seguido la evolución en el contenido de trans-resveratrol por medio de la técnica LD-REMPI-TOFMS sino que se ha analizado la inducción en los niveles de transcripción de la estilbeno sintasa, así como los índices de calidad para las uvas tratadas y no tratadas, mostrándose que existe una correlación entre los niveles de trans-resveratrol acumulados en la piel de la uva y los niveles de transcripción de la estilbeno-sintasa. De este modo, se ha visto como el pretratamiento con CO<sub>2</sub> disminuye el deterioro de las uvas, así como la acumulación de trans-resveratrol en la piel de la uva y los niveles de estilbeno-sintasa. Los resultados han mostrado

que la eficacia del pretratamiento con CO<sub>2</sub> en cuanto a la disminución del deterioro de las uvas no está mediada por la inducción de la expresión del gen estilbeno-sintasa.

Las características espectroscópicas de la molécula de trans-resveratrol han permitido demostrar una elicitación selectiva para dicha molécula en la uva de mesa mediante irradiación UV. Para ello, se irradiaron las uvas a diferentes longitudes de onda, una de ellas se correspondiente al máximo de absorción por parte de la molécula de trans-resveratrol ( $\lambda=302,1$  nm) y la otra a una longitud de onda no selectiva para dicha molécula ( $\lambda=300,0$  nm). El contenido en trans-resveratrol en las uvas de esta manera irradiadas ha demostrado que se puede aumentar el contenido en el mismo sometiéndolas a una irradiación con una longitud de onda resonante.

El carácter antifúngico no selectivo que presenta la molécula de trans-resveratrol ha permitido elaborar un protocolo, tomando como base los extractos procedentes de la maceración de la hoja de vid, de conservación de la uva durante un mayor periodo de tiempo, manteniendo la calidad de la uva. El resultado del mismo ha sido una mejora en la conservación de la uva de mesa que ha sido atribuible no solo al trans-resveratrol sino a otros compuestos antioxidantes presentes en el extracto. De esta manera se ha abierto la puerta al tratamiento natural de la uva con todos los beneficios tanto para la salud como medioambientales que su implantación implicaría.

La segunda parte de esta tesis ha estado dedicada fundamentalmente al acoplamiento de las diferentes técnicas GC y REMPI-TOFMS. Dicho acoplamiento ha sido el resultado de la unión directa de un GC a la anterior técnica LD-REMPI-TOFMS, para ello se han diseñado la interfase, cuya elaboración se ha llevado a cabo en los talleres del IP, y se han adquirido los elementos necesarios para asegurar el adecuado funcionamiento de ambos sistemas respetando las diferentes condiciones de trabajo de los mismos y adecuando unas condiciones aptas al flujo molecular desde que entra a la columna capilar del GC hasta que llega al punto de ionización. Dicho acoplamiento da nacimiento a una nueva técnica, GC-REMPI-TOFMS, que en síntesis supone la incorporación de un detector de mucha mayor potencia y selectividad que los comúnmente existentes para la GC.

Con el fin de llevar a cabo el análisis directo con la nueva técnica, se ha elegido el trans-estilbeno como analito, de modo que la técnica GC-REMPI-TOFMS se ha validado para

dicho compuesto de acuerdo con la norma EN-ISO-17025. Para ello, se han determinado los parámetros de repetibilidad ( $RSD = 2,15 \%$ ), reproducibilidad ( $RSD = 2,7\%$ ), linealidad ( $r = 0,998$ ), selectividad, exactitud ( $99,77\%$ ), límite de detección ( $3,8 \mu\text{g/L}$ ) y límite de cuantificación ( $12,8 \mu\text{g/L}$ ).

Una vez mostrada la validez de dicha técnica para el análisis de trans-estilbeno, se procedió al análisis del contenido de trans-estilbeno en una muestra natural de hoja de vid (variedad Aledo). La inyección directa de una cantidad de extracto, procedente de la maceración en etanol de la hoja de vid previamente filtrada, permitió calcular un contenido en trans-estilbeno en dicha hoja de vid de  $10,48 \mu\text{g/mL}$ .

Por último, con el fin de determinar la mejora que supone el acoplamiento con respecto a cada una de las dos técnicas individuales se han obtenido los límites de detección que proporcionan cada una de las técnicas: GC ( $12,8 \text{ ng}$ ), LD-REMPI-TOFMS ( $8,7 \text{ pg}$ ) y GC-REMPI-TOFMS ( $3,8 \text{ pg}$ ).

Por consiguiente, las principales **CONCLUSIONES** que se derivan del trabajo realizado en esta tesis y del análisis de los resultados obtenidos son por una parte, en lo que respecta a la mejora experimental del sistema LD-REMPI-TOFMS:

- 1) La separación de los procesos físicos de desorción e ionización, característicos de la técnica LD-REMPI-TOFMS, ha permitido obtener una mejora sustancial en la intensidad de señal obtenida para la molécula de trans-resveratrol. Este hecho, unido al empleo de una mayor resolución en la ionización, ha permitido obtener un espectro más resuelto dentro del intervalo REMPI para la molécula de trans-resveratrol.

Por otro lado, las excelentes condiciones que proporciona la técnica LD-REMPI-TOFMS en la detección y análisis de sustancias dentro de matrices complejas ha permitido:

- 2) Establecer una comparación en el contenido de trans-resveratrol obtenido por las técnicas LD-REMPI-TOFMS y HPLC para una misma muestra lo que ha puesto de manifiesto las ventajas y desventajas en el análisis del mismo por ambas técnicas que de otra manera solamente hubiera sido previsible.

- 3) Seguir la evolución del contenido de trans-resveratrol en los experimentos de anoxia en una atmósfera de nitrógeno ha permitido caracterizarlo como método de mejora en el contenido endógeno de trans-resveratrol en la piel de la uva. A partir de los resultados obtenidos con la uva ha sido posible la elaboración de un vino enriquecido en la molécula de trans-resveratrol.
- 4) Analizar el contenido de trans-resveratrol en muestras tratadas con CO<sub>2</sub>, que ha permitido concluir que un pretratamiento con CO<sub>2</sub> permite mejorar la apariencia y los índices de calidad de las uvas de mesa durante el almacenamiento en frío.

El hecho de poder variar la longitud de onda de ionización ha llevado a:

- 5) Observar una elicitación selectiva, en base al conocimiento de su espectro REMPI, del trans-resveratrol en la piel de la uva. Ello permite la posibilidad de obtener un método muy eficaz, preciso y rápido de elicitación de trans-resveratrol en la piel de la uva.

Al trabajar en unas condiciones REMPI para la molécula de trans-resveratrol y llevarse a cabo la ionización con pulsos del orden de 5 ns, así como el empleo de una resolución de  $\pm 0,05$  nm se ha logrado:

- 6) Observar una serie de bandas espaciadas en un intervalo fijo de frecuencias de 62 cm<sup>-1</sup>. La repetición del mismo haciendo uso de una máquina de Haces Moleculares, ha permitido obtener el mismo espectro en unas condiciones más frías vibro-rotacionales lo que ha redundado en un espectro más limpio.
- 7) En base a la comparación con otra molécula de estructura similar y mucho más documentada, trans-estilbeno, se ha podido caracterizar dicho espaciado con un movimiento concreto de torsión en torno al fenilo. La naturaleza de dicho movimiento da lugar a que se trate de un movimiento umbral, dada las condiciones de baja energía en las que se ha obtenido el espectro de la molécula, en la isomerización trans→cis del resveratrol.

La ventaja de la separación de cada una de las etapas constitutivas en la técnica LD-REMPI-TOFMS ha permitido acoplar un cromatógrafo a dicha técnica dando lugar a la técnica GC-REMPI-TOFMS de donde:

- 8) De dicho acoplamiento se desprende una sinergia, que entre otros parámetros, se pone de manifiesto por el mayor límite de detección obtenido con la técnica acoplada que pasa cada una de manera independiente.
- 9) Se ha validado la técnica con un compuesto de interés biológico, el trans-estilbeno, con el fin de caracterizar el sistema experimental y determinar las condiciones óptimas para el análisis. Los valores obtenidos para todos los parámetros incluidos en el procedimiento están dentro de los límites establecidos por la normativa vigente.
- 10) Este nuevo método se ha aplicado a la detección y análisis directo en el contenido de trans-estilbeno en una muestra natural de hoja de vid por inyección directa en el cromatógrafo de gases de un extracto de hoja previamente filtrado, obteniéndose una concentración de 10,48 µg/mL

## **7. BIBLIOGRAFÍA.**

1. Traldi, P; Magno F; Lavagnini I; Seraglia R; *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*. 1ª Edición. Ed. John Wiley & Sons. ISBN: 0-470-02516-6 (2006).
2. Blau, G.; King, G.S. *Handbook of Derivates for Chromatography*. 1ª Edición. Ed. Heyden & Son: London. ISBN: 0855012064 (1977).
3. Halket, H.M.; Zaikin, V.G. *Derivatization in Mass Spectrometry-1.Silylation*. Eur. Mass Spectrom. **9** 1-21 (2003).
4. Lehmpuhl, D. W.; Birks, J.W. *J.Chromatogr. A* . **71** 740 (1996).
5. Zimmermann, R.; Rohwer, E. R.; Heger, H. J.; Boesl, U.; Kettrup, A. *Verfahren zum Nachweis von Substanzen und Substanzklassen*. German Patent DE 19754161, European Patent pending.
6. Cooke; Nickless, G.; Prescott, A.M; Roberts, D. J. *J. Chromat.* **156** 293 (1978).
7. Hübschmann, G. *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*; Ed. John Wiley & Sons: Weinheim, (2001).
8. Spiteller, G. *Mass Spectrom. Rev.***1**, 29-62 (1982).
9. Dong. M.W. *Modern HPLC for Practicing Scientists* Ed. John Wiley & Sons ISBN: 047172789X (2006).
10. Kienitz, H. *Einführung, in Massenspektrometrie*. Ed. Verlag Chemie: Weinheim (1968).
11. De Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry- Principles and Applications*; 2ª ed. Ed. John Wiley&Sons: Chichester (2001).
12. Gross, J. H. *Mass Spectrometry*. Ed. Springer . ISBN 978-3-540-40739-3 (2004).
13. Kondrat, R. W. *J. Mass Spectrom.* **212** 89-95 (2001).

14. Wiley W.C. *Science* **124** 817-20 (1956).
15. W.C. Wiley, I.H.McLaren. *Rev. Sci. Instrum.* **26** 1150-1157 (1955).
16. Guilhaus, M. *J. Mass Spectrom.* **30** 1519-1532 (1995).
17. Vestal, M.L.; Juhasz, P.; Martin, S.A. *Mass Spectrom.* **9** 1044-1050 (1995).
18. J.Throck Watson. *Introduction to mass spectrometry*. 3ª Edición Ed. Lippincott Williams&Wilkins. ISBN 0-3975168-8-6 (1997).
19. J. C. Holmes; F. A. Morrell. *Appl. Spectry.* **11** 86 (1957).
20. Gohlke, RS. *Anal. Chem* **31** 535-41 (1959).
21. Niessen, W. M.A *Current Practice on Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Ed., Marcel Dekker. ISBN 0-8247-0473-8 (2001).
22. Richardson, S.D. *Chem. Rev.* **101**(2) 211-254 (2001).
23. Leclerq, P.A.; Camers, C.A. *High-Speed GC-MS. Mass Spectrom. Rev.* **17** 37-49 (1998).
24. Hirsch, R.; Ternes, T.A.; Bobeldijk, I. *Chimia.* **55** 19-22 (2001).
25. Noble, C. A.; Prather, K.A. *Mass Spectrom. Rev.***19** (4) 248-274 (2000).
26. Sinha. A.E.; Fraga C.G.; Prazen B.J.; Synovec R. E.; *J. of chromatography A*, **1027** 269-27 (2004).
27. McLafferty, F.W . *Tandem Mass Spectrometry*; 1ª ed. Ed. John Wiley & Sons. New York, 1983.
28. March, R.E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **200** 285-312 (2000).



29. Niessen, W.M.A.; Voyksner, R.D. *Current Practice of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Ed. Elsevier: Amsterdam. ISBN 0-8247-1936-0 (1998).
30. Ardrey, R.E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-An Introduction*. Ed. John Wiley & Sons: Chichester. ISBN: 0471498017 (2003).
31. Reemtsma, T. TrAC, *Trends Anal. Chem.* **20** (10) 533-542 (2001).
32. Frias, M. M.; Frenich, A.G.; Vidal, J.L. M.; Sanchez, M. M.; Olea, N. *J. Mass Spectrom.* **35** (8) 967-975 (2000).
33. <http://www.varianinc.com>
34. Croley, T.R.; Hughes, R.J.; Koenig, B.G.; Metcalfe, C.D.; March, R.E. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **14** (13) 1087-1093 (2000).
35. Ternes, T.A. *Trac-Trends Anal. Chem.* **20** (8) 419-434 (2001).
36. Hirsch, R.; Ternes, T.A.; Bobeldijk, I.; Weck, R.A. *Chimia.* **55** (1) 19-22 (2001).
37. Leonard, C.; Sacks, R. *Anal. Chem.* **71** (22) 5177-5184 (1999).
38. Maizels, M.; Budde, W. L. *Anal.Chem.* **73** (22) 5436-5440 (2001).
39. Hughey, C.A.; Hendrickson, C.L; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. Kendrick. *Anal. Chem.* **73** 4646-4681 (2001).
40. Wu, Z.; Hendrickson, C.L.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. *Anal.Chem.* **74**, 1879-1883 (2002).
41. Moritz, T.; Olsen, I.E. *Anal. Chem.* **67** 1711-1716 (1995).
42. Fenner, N.C.; Daly, N.R. *Rev. Sci. Instrum.* **37** 1068-1070 (1966).

43. Vastola, F.J.; Pirone, A.J. *Adv. Mass Spectrom.* **4** 107-111 (1968).
44. Posthumus, M.A.; Kistemaker, P.G.; Meuzelaar, H.L.C.; Ten Noever de Brauw, M.C. *Anal. Chem.* **50** 985-991 (1978).
45. Coates, M.L.; Wilkins, C.L. *Biomed. Mass Spectrom.* **12** 424-428 (1985).
46. Barber, M.; Bordoli, R.S.; Sedwick, R.D.; Tyler, A.N. *Nature.* **293** 270-275 (1981).
47. Macfarlane, R.D.; Torgerson, D.F. *J. Mass Spectrom. Ion Phy.* **21** 81-92 (1976).
48. Macfarlane, R.D. *Brazilian J. Phys.* **29** 415-421 (1999).
49. Mark, T.D.; Futrell, J.H.; *In Gaseous Ion chemistry and spectroscopy* Ed. John Wiley & Sons. New York. (1986).
50. Lubman, D.M. *Laser and Mass Spectrometry*. Ed. Oxford University press, New York, 1990.
51. Zimmermann, R; Dorfner, R; Kettrup, A. *J. Analytical and Applied Pyrolysis* **49** 257-266 (1999).
52. Shellie, R; Mondello, L; Marriott, P; Dugo, G. *J. Chromatography A* **970** 225-234 (2002).
53. Dallüge, J; Van Stee, L.L.P.; Xu, X.; Williams, J.; Beens, J.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A. *J. Chromatography A.* **974** (200) 169-184 (2002).
54. Dallüge, J.; Van Rijn, M.; Venís, J.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A. *J. Chromatography A* **965** 207 (2002).
55. Woywod, C.; Livingood, W.C.; Frederick, J.H. *J.Chem.Phys.* **114** 1631-1644 (2001).
56. Ford, M.S.; Haincs, S.R.; Pugliesi, I.; Dessent, C.L. H.; Muller-Dethlefs, K.; *J.Electron Spectrosc.* **112** 231-239 (2000).

57. Richter, R.C.; Khamaganov, V.I.; Hynes, A.; *J.Chem. Phys. Lett.* **319** 341-348. (2000).
58. Bescós, B.; Orea, J.M.; Montero, C.; Gonzáles Ureña, A.; Weickhardt, C.; Bolees, U.; Schlag, E.W. *Chem. Phys. Lett.* **287** 371-378 (1998).
59. Polanyi, J.C.; Sze, N.S.; Wang, J.X. *J.Phys.Chem.* **101** (8) 6679-6687 (1997).
60. Garnica, R.M; Appel, M.F.; Eagan, L.; McKeachie, J.R.; Benter, T. *Anal. Chem.* **72** 5639-5646 (2000).
61. Heger, H.J.; Zimmermann, R.; Dorfner, R.; Beckmann, M.; Griebel, H.; Kettrup, A.; Boesl, U. *Anal.Chem.* **71** 46-57 (1999).
62. Oser, H.; Coggiola, M.J.; Faris, G.W.; Young, S.E; Volquardsen, B; Crosley D.R. *App.Opt.* **40** 859-865 (2001).
63. Collum, B.M.; Shealy, S.K.;Angel, S.M. *Appl.Spectrosc.* **53** 1646-1650 (1999).
64. Buchelli, T.D.; Haeffliger, O.P.; Dietiker, R.; Zenobi, R. *Anal.Chem.* **72** 3671-3677 (2000).
65. Haeffliger, O.P.; Zenobi, R. *Anal.Chem.* **70** 2660-2665 (1998).
66. Zenobi, R.; Zhan, Q.; LangridgeSmith, PRR. *Macromolecules.* **29** 7865-7870 (1996).
67. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78** 53-68 (1987).
68. Siuzdak, G. "The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology". *MCC Press: San Diego*, 2003.
69. Menzel, C.; Dreisewerd, K.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp. *Int. J. Mass Spectrom.* **207** 73-96 (2001).

70. Orea Rocha, J.M.; Bescós, B.; Montero, C.; González Ureña, A.; *Anal. Chem.* **70** 491-497 (1998).
71. Kinsel, G. R.; Lindner, J.; Grotemeyer, J. *J. Phys. Chem.* **96** 3162-3168 (1992).
72. J.Gormally, *Trends Anal. Chem.* **11** 10-15 (1992).
73. Stephens, W.E. *Phys. Rev.* **69** 691 (1946).
74. Montero, C.; Orea, J.M.; Muñoz, M.S.; Lobo, R.F.; González Ureña, A.; *Applied Physics B.* **71** 601-605 (2000).
75. Zare, R. N. *Science* **226** 298 (1984).
76. Zimmermann, F. M.; Who, W. *J. Chem. Phys.* **100** 7700 (1994).
77. Boels, U.; Zimmermann, R.; Weickhardt, C.; Lenoir, D.; Schramm, K. W.; Kettrup, A.; Slach, E.W. *Chemosphere.* **29** 1429 (1994).
78. Boels, U.; Weinkauff, R.; Slach, E. W. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* **112** 121. (1992)
79. Cotter, R. *J. Anal. Chim. Acta.* **195** 45 (1987).
80. Bernstein, E. R.; Law, K.; Schauer, M. *J. Chem. Phys.* **80** 207 (1984).
81. Mayo, S.; Lucatorto, T. B.; Luther, G. G. *Anal. Chem.* **54** 553. (1982)
82. Zhang, L.; Pei, L.; Dai, J.; Zhang, T.; Chen, C.; Yu, S.; Ma, X. *Chem. Phys. Lett.* **259** 403 (1996).
83. Al-Kahali, M. N.; Donovan, R. J.; Ridley, T. *Chem. Phys.* **208** 165 (1996)
84. Milan, J.B.; Buma, W. J.; Ashfold, M. N. R. *Chem. Phys. Lett.* **239** 326. (1995)

85. Weickhardt, C.; Boels, U.; Slach, E. W. *Anal. Chem.* **66** 1062 (1994).
86. Numata, Y.; Ishii, Y.; Watahiki, M.; Suzuka, I.; Ito, M. *J. Phys. Chem.* **97** 4930 (1993).
87. Steenvoorden, R. J. J. M.; Vasconcelos, M. H.; Kistemaker, P. G. *J. Mol. Spectrosc.* **161** 17 (1993).
88. Kovalenko, L. J.; Maescheling, C. R.; Clemett, S. J.; Philippoz, J. M.; Zare, R. N.; Alexander, C. M. *Anal. Chem.* **64** 682 (1992).
89. Jiménez Sánchez, J.B. *Espectroscopía Láser resonante para análisis de alimentos*. DEA UCM. (2002)
90. Montero Catalina, C. *Desarrollo de técnicas de espectroscopia láser y su aplicación al análisis químico de alimentos*. Tesis Doctoral UCM. (2004)
91. Ingham, J.L. *Phytochemistry*. **15** 1791-1793 (1976).
92. Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. *Am. J. Enol. Vitic.* **42** 41-46 (1991).
93. Barlass M.; Miller RM.; Douglas TJ. *Am. J. Enol. Vitic.* **38** 65-68 (1987).
- 94.- Jeandet, P.; Douillet-Breuil AC.; Bessis R.; Debord S.; Sbaghi M.; Adrian M. *J. Agric. Food Chem.* **50** 2731-2741 (2002).
95. Dai GH.; Andary C.; Mondolot-Cosson L.; Boubals D. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* **46** 177-188 (1995).
96. Hoos G, Blaich RJ. *J. Phytopathol.* **129** 102-110 (1990).
97. Soleas, G.J.; Dam, J.; Carey, M.; Goldberg, D.M. *J. Agric. Food Chem.* **45** 3871 (1997).
98. Adrian, M.; Rajaei, H.; Jeandet, P.; Veneau, J.; Bessis, R. *Phytopathol.* **88** 472-476 (1998).

99. Kimura, Y.; Ohminami, H.; Okuda, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Arichi, S. *Planta Med.* **49** 51-54 (1983).
100. Lee, S.S.; Lee, S.M.; Kim, M.; Chun, J.; Cheong, Y.K.; Lee, J.; *Food Res. Int.* **37** 247 (2004).
101. Marois, J.J.; Bledsoe, A.M.; Bettiga, L.J. *Am. J. Enol. Vitic.* **37** 293 (1986).
102. Pezet, R.; Pont, V. *Phytopathol. Z.* **11** 73 (1984).
103. Dai, G.H.; Andary, C.; Mondolot-Cosson, L.; Boubals, D. *Europ. J. Pl. Pathol.* **101** 541 (1995).
104. Schlösser, E. *Acta Hort.* **381** 615 (1994).
105. Matern, R.U. *Acta Hort.* **381** 448 (1994).
106. Bertelli, A.A.E.; Giovannini, L.; Migliori, M.; Bernini, W.; Fregoni, M.; Bertelli, A. *Int. J. Tissue React.* **17** 1-3 (1995).
107. Frankel, E.N.; Kanner, J.; German, J.B.; Parks, E.; Kinsella, J.E. *Lancet* **341** 454-457 (1993).
108. Jang M.; Cai L.; Udeani, G.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, Ch.W.W.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Mehta, R.G.; Moon, R.C.; Pezzuto, J.M. *Science* **275** 218-220 (1997).
109. Frankel, E.N.; Meyer, A.S. *Pharm. Biol.* **36** 14-20 (1998).
110. Parr, A. J.; Bolwell, G.P.; *J.Sci. Food Agric.* **80** 985-1012 (2000).
111. Cassidy, A.; Hanley, B.; Lamuela-Raventos, R. M. *J. Sci. Food Agric.* **80** 1044-1062 (2000).

- 
112. Min, S.; Guo-Liang, J.; Yue-Min, W.; Heng, M.; *Vascular Pharmacology* **45** (2) 122-126 (2006).
113. Meltem, K.; Göksel, S.; Sule, C.; Nursal, G.; İnci, A. *J. Surgical Research* **134** (2) 315-321 (2006).
114. Jin-Chun C.; Jian-Guo F.; Wei-Feng C.; Bo Z.; Li, Y.; Zhong-Li, Liu.; *Bioorganic Chemistry* **34** (3) 142-157 (2006).
115. Counet, C.; C, Delphine, Collin, S. *Food Chemistry* **98** (4) 649-657 (2006).
116. Soleas, G.J.; Diamandis, E.P.; Karumanchiri, A. *Anal. Chem.* **69** 4405-4409 (1997).
117. Jeandet, P.; Bessis, R.; Maume, B.F.; Meunier, P.; Peyron, D.; Trollar, P. *J. Agric. Food. Chem.* **43** 316-319 (1995).
118. Juan, M. E.; Lamuela-Raventós, R.M.; de la Torre Boronat, M.C.; Planas, J.M. *Anal. Chem.* **71** 747-750 (1999).
119. Sobolev, V.S.; Cole, R.J. *J.Agric. Food Chem.* **47** 1435-1439 (1999).
120. Jeandet, P.; Breuil, A.C.; Adrian, M.; Weston, L.A.; Debord, S.; Meunier, P.; Maume, G.; Bessis, R. *Anal. Chem.* **69** 5172-5177 (1997).
121. Berzas Nevado, J.J.; Contento Salcedo, A.M.; Castañeda Penalvo, G. *Analyst* **124** 61-66 (1999).
122. Arce, L.; Tena, M.T.; Ríos, A.; Valcarcel, M. *Anal. Chim. Acta* **359** 27-38 (1998).
123. Pazourek, J.; González, G.; Revilla, A.L.; Havel, J. *J Chromatogr. A.* **874** 111-119 (2000).
124. Godberg, D.M.; Karumanchiri, A.; Yan, J.; Diamandis, E.P.; Soleas, G. J. *J. Chrmatogr. A.* **708** 89-98 (1995).

125. Pezet, R.; Pont, V.; Cuenta, P. *J. Chromatogr. A.* **663** 191-197 (1994).
126. Goldberg, D.M.; Tsang, E.; Levesque, M.; Soleas, G. J. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **22** 1843-1855 (1999).
127. Soleas, G. J.; Goldberg, D. M.; Ng, E.; Karumanchiri, A.; Tsang, E.; Diamandis, E.P. *Am. J.Enol.Vitic.* **48** 169-176 (1997).
128. Roggero, J.P.; Archier, P; Coen, S. *In Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*; Watkins, T.R., Ed.; ACS Symposium Series 661; American Chemical Society: Washinton, dc, 6-11 (1997).
129. Malovaná, S.; García Montelongo, F.J.; Pérez, J.P.; Rodríguez Delgado, M.A. *Anal. Chim. Acta.* **428** 245-253 (2001).
130. Romero Pérez, A.I.; Ibern-Gómez, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; De la Torre-Boronat, M.C. *J.Agric. Food Chem.* **47** 1533-1536 (1999).
131. Golberg, D.M.; Tsang, E.; Karumanchiri, A.; Diamandis, E.P.; Soleas, G. J.; Ng, E. *Anal.Chem.* **68** 1688-1694. (1996)
132. Mc Murtrey, K.D.; Minn, J.; Pobanz, K.; Shults, T.P. *J.Agric.Food Chem.* **42** 2077-2080 (1994).
133. Chu, Q.; O'Dwyer, M.; Zeece, M.G. *J.Agric.Food Chem.* **46**, 509-513. (1998)
134. Montero, C.; Bescos, B.; Orea, J.M.; Gonzáles Ureña, A. *Anal. Chem.* **19** 1-19 (2000).
135. Skowronek, S. *Espectroscopia y Dinámica de Moléculas de van der Waals*. Tesis Doctoral . UCM (1997).
136. Skowronek, S.; Jiménez, J.; González Ureña, A.; Stern, V.; Farmanara, P.; Radloff , W.; Noack, F. *Physical Review A* **59** 1727- 1731 (1999).



137. Skowronek, S.; Jiménez, J.B.; González Ureña, A.; *Chem. Phys. Letters* **303** 275-280 (1999).
138. Waldeck, D.H.; *Chem. Rev.* **91** 415 (1991).
139. Myers, A.B.; Rodier, J.M.; Philips D.L. Ed. in J. Jortner et al. *Reaction Dynamics in clusters and condensed phases*, kluwer, Dordrecht, 1994 . pp. 261-278.
140. C.Dietl, E. Papastathopoulos, P. Niklaus, R. Improta, F. Santero, G. Gerber *Chem. Phys.* **310** 201-211 (2005).
141. Jack Cazes Ewing's Analytical Instrumentation handbook. 3<sup>a</sup> ed. ISBN: 0-8247-5348-8. (2005)
142. Jiménez Sánchez, J.B.; Crespo Corral, E.; Santos Delgado, M.J.; Orea, J.M.; González Ureña, A. *J of chromatography A*. **1074** 133-138. (2005).
143. Careri, M.; Carradini, C.; Elvira, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I.; *J. Agric. Food Chem.* **51** 5226 (2003).
144. Scalbert A.; Williamson G.; *J. Nutrit.* **130** 1073-2085 (2000).
145. Cooper KA.; Chopra M.; Thurnham DI. *Nutrit. Res. Rev.* **17** 111-129 (2004).
146. Jeandet P.; Bessis R.; Sbaghi M.; Meunier P. *J. Phytopathol.* **143** 135-139 (1995).
147. Langcake P. *Physiol. Plant Pathol.* **18** 213-226. (1981).
148. Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I. *J. Agric. Food Chem.* **52** 6868-6874 (2004).
149. Gambutti, A.; Strollo, D.; Ugliano, M.; Leche, L.; Moio, L. *J. Agric. Food Chem.* **52** 5747-5751. (2004)

150. Goldberg D.M.; Karumanchiri, A.; Diamandis, E.P.; Ng, E. *J. Wine Res.* **6** 107-121 (1995).
151. Monagas, M.; Bartolome, B.; Gomez-Cordoves, C. *Eur. Food Res. Technol.* **220** 331-340 (2005).
152. Threlfall, R.T.; Morris, J.R.; Mauromoustakos, A. *Am. J. Enol. Vitic* **50** 57-64 (1999).
153. Castellari, M.; Spinabelli, U.; Riponi, C.; Amati, A. *Eur. Food Res. Technol.* **206** 151-155 (1998).
154. Lamuela Raventós, R.M.; Romero Pérez, A.I.; Waterhouse, A.L.; De la Torre Boronat, M.C. *J. Agric. Food Chem.* **43** (2) 281 (1995)
155. Gu, X.; Chub, Q.; Dwyer, O.; Zeece, M. *J. Chromatogr.* **881** (1-2) 471 (2000).
156. González Ureña, A.; Orea, J.M.; Jiménez Sánchez, J.B. *Método para aumentar el contenido endógeno de trans-Resveratrol en uvas mediante tratamientos anóxicos cortos*. Patente N° P200402367.
157. Jiménez, J.B.; Orea, J.M.; González Ureña, A.; Escribano, P.; López de la Osa, P.; Guadarrama, A. *European Food Research and Technology*. En prensa.
158. Adrian M.; Jeandet P.; Douillet-Breuil A.C.; Tesson, L.; Bessis, R. *J. Agric. Food Chem.* **48** 6103-6105 (2000).
159. Cantos E.; Espin, J.C.; Tomas-Barberan, F.A.; *J. Agric. Food Chem.* **49** 5052-5058 (2001).
160. Versari, A.; Parpinello, G.P.; Tornielli, G.B.; Ferrarini, R.; Giulivo, C. *J. Agric. Food Chem.* **49** 5531-5536 (2001).
161. Langcake, P.; Pryce, R.J.; *Phytochem.* **16** 1193-1196 (1977).

162. Douillet-Breuil, A.C.; Jeandet, P.; Adrian, M.; Bessis, R.; *J. Agric. Food Chem.* **47** 4456-4461 (1999).
163. Cantos, E.; Tomas-Barberan, F.A.; Martínez, A.; Espin, J.C.; *Eur. Food Res. Technol.* **217** 253-258 (2003).
164. Roggero, J.P. *J. Food Comp. Anal.* **13** 93-97 (2000).
165. Orea, J.M.; Montero, C.; Jiménez, J.B.; González Ureña, A. *Anal. Chem.* **73** 5921-5929 (2001).
166. Sbaghi, M.; Jeandet, P.; Faivre, B.; Bessis, R.; Fournioux, J.C. *Euphytica* **86** 41-47 (1995).
167. Sarig, P.; Zutkhi, Y.; Monjauze, A.; Lisker, N.; Ben-Arie, R. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50** 337-347 (1997).
168. Nigro, F.; Ippolito, A.; Lima, G.; *Postharv. Biol. Technol.* **13** 171-181 (1998).
169. Borie, B.; Jeandet, P.; Parize, A.; Bessis, R.; Adrian, M. *Am. J. Enol. Vitic.* **55** 60-64 (2004).
170. Raposo, R.; Delcan, J.; Gómez, V.; Melgarejo, P. *Plant Pathol.* **45** 497-505 (1996).
171. Yahia, E.M.; Nelson, K.; E., Kader, A.A.; *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **108** 1067-1071 (1983).
172. Crisosto, C. H.; Garner, D.; Crisosto, G.; *Postharvest Biol. Technol.* **26** 181-189 (2002).
173. Retamales, J.; Defilippi, B.G.; Arias, M.; Castillo, P.; Manríquez, D. *Postharvest Biol. Technol.* **29** 177-182 (2003).
174. Sánchez Ballesta, M.T.; Jiménez, J.B.; Romero, I.; Orea, J.M.; Maldonado, R.; González Ureña, A.; Escribano, M.I.; Merodio, C. *Postharvest Biology and Technology*. En prensa.

175. Montero C.; Cristescu, S.M.; Jiménez, J.B.; Orea, J.M.; Te Lintel Hekkert, S.; Harren ,FJM.; González Ureña, A. *Plant Physiol.* **131** 129-138 (2003).
176. González Ureña, A.; Orea J.M.; Montero C.; Jiménez, J.B.; González, J.L.; Sánchez, A.; Dorado, M. *J. Agric. Food Chem.* **51** 82-89 (2003).
177. González Ureña, A.; Orea, J.M.; Montero Catalina, C.; Jiménez Sánchez, J.B.; *Método para aumentar la resistencia de la uva a la infección y maduración mediante la aplicación externa de extractos naturales obtenidos a partir de la vid.* Patente N° P200200913.
178. Geasic, J.E.; Marcos, H.H.; Van Viter, L.G. *Appl. Phys. Letters* **4** 182 (1964)
179. Stitch, M.L. *Láser Handbook*, vol 1, Amsterdam: North-Holland (1972).
180. ESDU Fluid Mechanics Vol 1. 66027.
181. Levy, D.H.; Wharton, L.; Smalley, R.E. *Chemical and Biochemical Applications of Lasers* **2** 1 (1977).
182. Liverman, M.G.; Beck, S.M.; Monts, D.L.; Smalley, R.E. *J. Chem. Phys.* **70** (1) 129 (1979).
183. Smalley, R.E. *Láser Chem* **2** 167 (1983).
184. G. Scoles Ed., *Atomic and Molecular Beam Methods*, Vol.I, Oxford University Press (1988).
185. Griffiths, P.R.; Soane, H.J.; Hannah, R.W.; *Appl. Spectrosc.* **31** 485 (1977).
186. Schrader, B.; Niggemann, W.; Belz, H.H.; Schallert, B. *Z. Chem.* **21** 249 (1981).

187. Mattson, D.R. *Appl. Spectrosc.* **32** 335 (1978).
188. *Installation and User Guide*: Diffuse reflectance accesory for FTIR Spectrometers FTIR-8400 S. Pike Technologies, Inc.
189. Numata, Y.; Ishii, Y.; Watahiki, M.;Suzuka, I.; Ito, M. *J. Phys. Chem.* **97** 4930 (1993).
190. Aggarwal, B.B.;Bhardwaj, A.;Aggarwal, R.S.;Seeram, N.P.;Shishodia, S.;Takada, Y. *Anticancer Research.* **24** (5A) 2783-2840 (2004).
191. Liu, Y.; Wen, D.; Chen, Z.; Liao, Y.; Liu, H. *Chinese Journal Of Chromatography* **22** 583-588 (2004).
192. Soleas, G.J.;Goldberg, D.M.; Diamandis, E.P.; Karumanchiri, A.;Yan, J.;Ng, E.; *Am.J.Enol.Vitic.* **46** 3 346-352 (1995).
193. Rodríguez-Delgado, M.A.; Malovana, S.; Pérez, J.P.; Borges, T.;García-Montelongo, F.J. *J. Chromatogr. A* **912** 249 (2001).
194. Stecher, G.; Huck, C.W.; Popp, M.; Bonn, F. *J. Anal. Chem.* **371** 73 (2001).
195. E, Fallik.; Y, Poleyaba.; Tuvia-Alkalai, S.; Salmón, Y.; Zuckermann, H. *Postharv. Biol. Technol.* **29** 233-236 (2003).
196. Artés-Hernández, F.; Tomás-Barberán, F.A.; Artés, F. *Postharvest Biol. Technol.* **39** 146-154 (2006).
197. Salzman, R.A.; Fujita, T.; Zhu-Salzman, K.; Hasegawa, P.M.; Versan, R.A. *Plant Mol. Biol. Rep.* **17** 11-17 (1999).
198. Adrian, M.; Jeandet, P.; Douillet Breuil, A.C.; Tesson, L.; Bessis, R. *J. Agricult Food Chem.* **48** 6103-6105 (2000).

199. Creasy, L.L.; Coffee, M. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **113** 230–234 (1988).
200. Douillet-Breuil, A.C.; Jeandet, P.; Adrian, M.; Bessis, N. *J. Agricult. Food Chem.* **47** 4456-4461 (1999)
201. González-Barrio, R.; Beltrán, D.; Cantos, E.; Gil, M.I.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. *J. Agric. Food Chem.* **54** 4222-4228 (2006).
202. Preisig-Müller, R.; Schwekendiek, A.; Brehm, I.; Reif, H.J.; Kindl, H. *Plant Mol. Biol.* **39** 221-229 (1999).
203. Sparvoli, F.; Martin, C.; Scienza, A.; Gavazzi, G.; Tonelli, C.; *Plant Mol. Biol.* **24** 743-755 (1994).
204. Wiese, W.; Vornam, B.; Krause, E.; Kindl, H. *Plant Mol. Biol.* **26** 667-677 (1994).
205. Hain R.; Reif, H.J.; Krause, E.; Langebartels, R.; Kindl, H.; Vornam, B.; Wiese, W.; Schmelzer, E.; Schreier, P.H.; Stöcker, R.H.; Stenzel, K. *Nature* **361** 153-156 (1993).
206. Thomzik, J.E.; Stenzel, K.; Stöcker, R.; Schreier, P.H.; Hain, R.; Stahl, D.J. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* **51** 265-278. (1997)
207. Zhu, Y.J.; Agbayani, R.; Jackson, M.C.; Tang, C.S.; Moore, P.H. *Planta* **220** 241-250 (2004).
208. Borie, B.; Jeandet, P.; Parize, A.; Bessis, R.; Adrian, M. *Am. J. Enol. Vitic.* **55** 60-64 (2004).
209. Bais, A.J.; Murphy, P.J.; Dry, I.B. *J. Plant Physio.* **27** 425-433 (2000).

210. Jiménez, J.B.; Orea, J.M.; Montero, C.; González Ureña, A.; Navas, E.; Slowing, K.; Gómez-Serranillos, M.P.; Carretero, E.; De Martines, D. *J. Agricul Food Chem.* **53** 1526-1530 (2005).
211. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
212. Varian Scanview 7.0 “*Chromatography and spectroscopy Applications Database* “.
213. Grob, R.L.; Eugene, F.B. *Modern Practice of Gas Chromatography*. Ed. John Wiley&Sons (1995). ISBN 0471597007.
214. Storch de Gracia, J.M. *Fundamentos de la cromatografía de gases*. 2ª ed. Ed. Alambra.
215. Willard, H.H.; Merrit, L.L.; Dean, J.A.; Settle, F.A. *Métodos instrumentales de análisis* 1998. Ed. Iberoamérica.
216. Aldrich Chemical Company Inc., *Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee WI, 1990, 1.
217. UNE-EN-ISO 8402. *Gestión de la calidad y Aseguramiento de la calidad*. 2.18. (1995).
218. UNE-EN ISO 9000. *Sistemas de gestión de calidad. Fundamentos y Vocabulario ISO* (2000).
219. Dietrich, C.F. *Uncertainty, Calibration and probability. The Statistic of Scientific and Industrial Measurement*, 2ª Ed. Adam Hilger, Bristol, 1991.
220. ISO Guide 5725-2. *Internacional Organization for standarization, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results*. Geneva. (1994).
221. Anderson, R.J.; Holtorn, G. R.; McClain, W. M. *J. Chem. Phys.* **70** 4310 (1979).
222. Guilhaus, M. *J. Mass Spectrom.* **30** 1519-1532 (1995)

223. Cotter, R.J. *Anal. Chem.* **64** 1027-1039 (1992)
224. Weickhardt, C.; Moritz, F.; Grotemeyer, J. *Mass Spectrom. Rev.* **15**, 139-162. (1997)
225. Enke, C.G. *Adv. Mass Spectrom.* **14** 197-219. (1998)
226. Baranovic, G.; Zlatko, M. *Spectrochimica acta part A.* **54** 1017-1039 (1998).
227. Whe-Yi Chiang, Jaan Laane. *J. Chem. Phys.* **100** (12) 8755-8767 (1994).
228. Caruso, F.; Tanski, J.; Villegas-Estrada, A.; Rossi, M. *J. Agric. Food Chem.* **52** 7279-7285 (2004).
229. Catalán, J. *Chem. Phys. Lett* **421** 134-137 (2006).
230. Modern Spectroscopy. Hollas, J.M. Ed. John Wiley&sons 4<sup>th</sup> ed. 2005
231. Billes, F.; Mohammed-Ziegler, I.; Mikosch, H.; Holmgren, A. *J. Phys. Chem. A* **106** 6232-6241. (2002)
232. OMNIC “Aldrich Condensed Phase”, números 512 y 513.
233. Crawford, RMN. *Adv. Ecol. Res.* **23** 93-185. (1992)
234. Orea, J.M.; González Ureña, A. In W. Jongen Ed. “Fruit and Vegetable Processing: Maximising Quality” Woodhead Publishing Ltd. Cambridge (UK), pp. 233-266 (2002).
235. Artes-Hernandez, F.; Artes, F.; Tomás Barberán, F.A. *J. Agric. Food Chem.* **51** 5290-5295 (2003)
236. Del Cura, B.; Escribano, M.I.; Zamorano, J. P.; Merodio, C. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **121** 735-739 (1996)



237. Paul, B.; Chereyathmanjiyil, A.; Masih, I.; Chapuis, L.; Benoit, A. *FEMS Microb. Let.* **165** 65-70 (1998)
238. Boenke, A. *Analytica Chimica Acta.* **275** 3-8 (1993)
239. Opsal, R.R.; Owens, K.G.; Reilly, J.P. *Anal. Chem.* **57** 1884 (1985).
240. Lubman, D.M.; Jordan, R.M. *Rev. Sci Instrum.* **56** 373 (1985).
241. Comstock *time of flight mass spectrometer model TOF-101 operation manual.*
242. Streibel, T.; Hafner, K.; Mühlberger, F.; Adam, T.; Zimmermann, R. *Applied Spectroscopy* **60** 1 72-79 (2006)
243. Rink, Jörg E; Boesl, Ulrich *European Journal Of Mass Spectrometry (Chichester, England)* **9** 1 23-32 (2003)
244. Mass Spectral Interpretation. Terrence A. Lee. Ed. Wiley 2005. ISBN 0-471-97629-6.
245. Green, J.M. *Anal. Chem.* **68** 305, (1996).
246. Zimmermann, R.; Boesl, U.; Heder, H.J.; Rohwer, E.R.; Ortner, E.K.; Schlag, E.W.; Kettrup, A. *J. High Resol. Chromatogr.* **20** 461-470 (1997).

**8. ANEXOS: PUBLICACIONES Y PATENTES HASTA EL MOMENTO ACTUAL RELACIONADAS CON ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.**

Jiménez, J.B; Orea, J.M; Montero, C; González Ureña, A; Navas, E; Slowing, K; Gómez-Serranillos, M.P.; Carretero, E.; De Martines, D.

*Resveratrol treatment controls microbial flora, prolongs shelf life, and preserves nutritional quality of fruit.*

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2005) **53**, 1526-1530

Jiménez Sánchez, J.B; Crespo Corral, E; Santos Delgado, M.J; Orea, J.M; González Ureña, A.  
*Analysis of trans-resveratrol by laser ionization mass spectrometry and HPLC with fluorescence detection: Comparison between both techniques .*

Journal of Chromatography A (2005) **1074** , 133-138

Sánchez Ballesta, M.T; Jiménez Sánchez, J.B; Romero, I; Orea, J.M; Maldonado, R; González Ureña, A, Escribano, M.I; Merodio, C.

*Effect of high CO<sub>2</sub> pretreatment on quality, Fungal Decay and Molecular Regulation of Stilbene Phytoalexin Biosynthesis in Table Grape.*

Postharvest Biology and Technology (2006) **42**, 209-216

Jiménez, J.B; Orea, J.M; González Ureña, A; Escribano, P; López de la Osa, P; Guadarrama, A.

*Short anoxic treatments to enhance trans-resveratrol content in grapes and wine*

European Food Research and Technology (2006). En prensa.

González Ureña, A.; Orea Rocha, J.M.; Montero Catalina, C; Jiménez Sánchez, J.B.

Método para aumentar la resistencia de la uva a la infección y maduración mediante la aplicación externa de extractos naturales obtenidos a partir de la vid

ES-2193881 B1. PCT/RD0300173

González Ureña, A; Orea, J.M.; Jiménez, J.B;

*Método para aumentar el contenido endógeno de trans-resveratrol en uvas mediante tratamientos anóxicos cortos*

ES-2241480 A1.

González Ureña, A; Orea Rocha, J.M.; Jiménez Sánchez, J.B.; Escribano Saez, P.; Guadarrama Rodríguez, A.

*Método para aumentar el contenido endógeno de trans-resveratrol en vino.*

ES-2251308 A1 W06040377